

**UNIVERZITA KARLOVA**

**1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Studijní program: Vývojová a buněčná biologie



Disertační práce

Epigenetické aspekty normální a nádorové  
krvetvorby: role chromatin remodelační ISWI  
ATPázy

Epigenetic Aspects of normal and malignant  
hematopoiesis: role of chromatin remodeling ISWI  
ATPase.

**Autor dizertační práce: Mgr. Tomáš Zikmund**

**Školitel doktoranda: Prof. MUDr. Tomáš Stopka, Ph.D.**

Biotechnologické a biomedicínské centrum Akademie věd a Univerzity Karlovy  
ve Vestci (BIOCEV)

**Praha 2019**

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracoval zcela samostatně dle připomínek školitele Prof. MUDr. Tomáše Stopky, Ph.D. a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne: .....

Podpis: .....

Tomáš Zikmund

## Identifikační záznam

ZIKMUND, Tomáš. *Epigenetické aspekty normální a nádorové krvinek: role chromatin remodelační ISWI ATPázy. [Epigenetic Aspects of normal and malignant hematopoiesis: role of chromatin remodeling ISWI ATPase.]*, Praha 2019, český jazyk, 86 stran, čtyři přílohy, Disertační práce (Ph.D.), Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav BIOCEV, Vedoucí závěrečné práce Prof. MUDr. Tomáš Stopka, Ph.D.

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěl velice poděkovat svému školiteli prof. MUDr. Tomáši Stopkovi, PhD za veškeré vědecké či metodické instrukce a zejména pak za jeho pozitivní přístup, kreativitu a neutuchající vědecké nadšení avšak i kritický přístup, jichž se mi dodávalo pro mou motivaci při řešení náročných úkolů po celou dobu mého doktorského studia. Zároveň bych chtěl též poděkovat i Doc. MUDr. Pavlu Klenerovi, PhD za možnost participovat na zajímavých projektech se zajímavými lidmi jeho vědecké skupiny.

Řešení projektů, na jejichž základech byla vypracována tato disertační práce, probíhalo ve vědeckém týmu StopkaLab nejprve na Ústavu patologické fyziologie 1. lékařské fakulty a následně po jeho přestěhování do nové budovy biomedicínského centra BIOCEV ve Vestci. Chtěl bych zde velmi poděkovat kolegům obou pracovišť, se kterými jsem se po dobu celého studia měl možnost seznámit a kteří vždy vytvářeli velmi příjemné a přátelské prostředí. Jmenovitě děkuji kolegům StopkaLab v BIOCEV: Mgr. Juraji Kokavcovi, PhD (v podstatě většinu dovedností v práci s myšimi modely mám od něj); Mgr. Tereze Turkové za nezjištnou pomoc při přípravě mé prvoautorské publikace; Mgr. Heleně Paszekové a Kristině Léblové za laskavou pomoc s chovem myší a jejich genotypování. Děkuji i svým dalším kolegům: Dr. Pavlovi Burdovi (za své dovednosti s kvantitativní PCR vděčím jemu), Dr. Karině Savvulidi Vargové, Dr. Nikolovi Čuříkovi, Dr. Petře Bašové, Dr. Martině Dluhošové, Mgr. Filipu Savvulidimu (jež mě naučil základy průtokové cytometrie) a v neposlední řadě Dr. Vítu Pospíšilovi a přednostovi Ústavu patologické fyziologie doc. MUDr. Martinu Vokurkovi CSc.

Velké díky patří také mé manželce, MUDr. Magdaléně Klánové, PhD, za obětavost, péči a lásku. Stejně díky patří mým milým rodičům, prarodičům, sestře a příbuzným, kteří vždy stáli za mnou a podporovali mě během i nelehkých chvilí soustavné vědecké práce.

*Disertační práce byla vytvořena za podpory rozličných grantů:*

*GACR 18-01687S & 19-03586S z Grantové agentury České republiky.*

*KONTAKT LH15170 z MŠMT*

*AZV 16-27790A z MZ*

*Institucionální granty: UNCE 204021 UNCE/MED/016, PRVOUK-P24/LF1/3 a Progres Q26, SVV 260374/2017*

*GAUK 534212 z Grantové agentury Univerzity Karlovy.*

*Práce je součástí projektu BIOCEV – Biotechnology and Biomedicine Centre of the Academy of Sciences and Charles University (CZ.1.05/1.1.00/02.0109), from the European Regional Development Fund.*

## Obsah

<b>1</b>	<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>KLÍČOVÁ SLOVA .....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>KEYWORDS .....</b>	<b>10</b>
<b>5</b>	<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>11</b>
<b>6</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED .....</b>	<b>15</b>
6.1	Úvod .....	15
6.2	Chromatinová struktura a mechanismy její remodelace.....	15
6.3	ATPázy ISWI a jejich struktura .....	18
6.4	Chromatin remodelační komplexy, které obsahují ATPázy ISWI .....	18
6.5	Role proteinů ISWI v regulaci transkripce.....	20
6.6	ISWI komplexy v remodelaci chromatinu v průběhu replikace DNA .....	24
6.7	Vztah proteinů komplexů ISWI k opravám DNA .....	26
6.8	Vliv ISWI komplexů na globální strukturu chromozomu .....	30
6.9	Role remodelačních faktorů podrodiny ISWI a jejich interakčních partnerů v průběhu tkáňového vývoje savců .....	33
6.10	Úvod do krvetvorby .....	39
6.11	Thymocytární vývoj u myši.....	43
6.12	Role ISWI komplexů v nádorové biologii.....	48
<b>7</b>	<b>CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE .....</b>	<b>50</b>
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>51</b>
<b>9</b>	<b>SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ.....</b>	<b>52</b>
9.1	(1. publikace) <i>The ISWI ATPase Smarca5 (Snf2h) is required for proliferation and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells.</i> .....	52
9.2	(2. publikace) <i>ISWI ATPase Smarca5 Regulates Differentiation of Thymocytes Undergoing <math>\beta</math>-Selection</i> .....	54
9.3	(3. publikace) <i>Epigenetic Control of SPI1 Gene by CTCF and ISWI ATPase SMARCA5.</i> .....	57
9.4	(4. publikace) <i>Hematopoiesis in patients with mature B cell malignancies is deregulated even in patients with undetectable bone marrow involvement.</i> .....	62
<b>10</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>64</b>
<b>11</b>	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>72</b>
<b>12</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>74</b>
<b>13</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>86</b>

### 1 Abstrakt

Chromatin remodelační protein Smarca5 se účastní řady buněčných procesů, které jsou důležité jak z hlediska vývoje tkání, tak i z pohledu nádorové biologie. Mezi procesy, v průběhu kterých Smarca5 remodeluje chromatinovou strukturu, patří například genová transkripce, replikace a opravy poškozené DNA. Předpokládali jsme, že Smarca5 představuje esenciální molekulu pro modulaci chromatinu především ve vývojově časných a rychle se dělících progenitorech tkání, u nichž se často objevuje i zvýšená hladina transkriptu této ATPázy. Jednou z takovýchto tkání je i krvetvorba. Předmětem předkládané disertační práce je analýza vlivu deplece Smarca5 na proliferaci a diferenciaci krvetvorných progenitorů *in vivo* a zároveň hledání mechanismů narušení jejich vývoje. Pomocí námi vytvořeného myšího modelu s podmíněně deletovatelnou alelou (angl. „conditional knockout“) genu *Smarca5* v krvetvorných kmenových buňkách jsme zjistili, že deplece této ISWI ATPázy způsobuje akumulaci časných hematopoetických progenitorů a inhibici jejich maturace směrem do erytroidní a myeloidní řady. Proerytroblasty vykazovaly dysplastické změny a u podstatné frakce bazofilních erytroblastů se objevovala zástava buněčného cyklu na rozhraní fází G2/M. Předpokládaným mechanismem pozorovaných změn se ukázala být aktivace stresové dráhy proteinu p53, která je obvykle asociovaná s neopraveným poškozením DNA. Studium delecí genu *Smarca5* specificky v progenitorech lymfocytů také potvrdilo citlivost této buněčné linie ke ztrátě chromatin remodelačních aktivit zajišťovaných proteinem Smarca5. Výsledkem byla zástava vývoje na úrovni velmi časných T- a B-buněčných stádií a, podobně jako v případě erytroblastů, i aktivace dráhy proteinu p53. Nakřížením nulové alely genu *Trp53* do myši s delecí *Smarca5* jsme ovšem nezjistili výrazné zlepšení fenotypu, a domníváme se proto, že aktivace této signální dráhy není primární příčinou zástavy buněčného cyklu postižených vyvíjejících se lymfocytů. Nejvíce viditelné změny byly pozorovány v expresním profilu nezralých T-lymfocytů, který vykazoval známky vývojového opoždění. Maturovanější stádia exprimovala vývojově časná transkripty a zároveň nebyla schopna indukce exprese transkriptů specifických pro diferencované buňky. Data tedy naznačují, že gen *Smarca5* hraje roli v nastavení vývojově specifické genové exprese v časných stádiích vývoje. Tuto eventualitu jsme podobněji studovali na úrovni genů, jejichž exprese je regulována epigenetickým regulátorem CTCF. Zjistili jsme, že SMARCA5 facilituje vazbu proteinu CTCF do regulační oblasti genu *SPII/PU.1*, kde společně inhibují expresi tohoto velmi důležitého transkripčního faktoru krvetvorby. Domníváme se, že popsany mechanismus inhibice exprese genu *SPII/PU.1*

## Klíčová slova

---

může přispívat nádorovým buňkám akutní myeloidní leukémie k zablokování jejich diferenciaci do myeloidní řady krvinek. V souhrnu naše data ukazují, že remodelace chromatinu zajišťovaná ISWI ATPázou Smarca5 je nezastupitelná prakticky na všech úrovních hematopoézy od kmenových buněk a z nich odvozených nádorů až po terminálně diferencovaná stadia.

## 2 Klíčová slova

chromatin, krvinek, Smarca5, Snf2h, p53, AML, CTCF, ISWI



### 3 Abstract

Chromatin remodeling protein Smarca5 participates on many cellular processes, which are important for tissue development and tumorigenesis. Among these processes utilizing ATPase activity of Smarca5 belong also transcription, replication and DNA repair. We hypothesized that Smarca5 represents essential molecule for chromatin modulation primarily at early developmental stages at the level of fast-dividing progenitors of many origins, in whose the ATPase is highly expressed. To such tissues may belong also hematopoiesis, in which the Smarca5 has highest expression. The subject of my doctoral thesis is therefore analysis of the effect Smarca5 depletion on proliferation and differentiation of hematopoietic progenitors *in vivo* and a search for mechanisms behind the resulted developmental defects. We utilized conditionally knockout allele of Smarca5 in blood precursors to study in a mouse model how depletion of the ISWI ATPase causes accumulation of earliest progenitors inhibited from further maturation to erythroid and other myeloid lines. The proerythroblasts became dysplastic and the majority of basophilic erythroblasts ceased cycling around the G2/M stage. An expected mechanism for observed changes appeared the activation of stress pathway of protein p53 that is often associated with unrepaired DNA damage. Analysis of Smarca5 deletion in progenitors of lymphocytes also revealed that this lineage is very sensitive to loss of chromatin remodeling activities of Smarca5. We also observed that a block of development in very early T and B cell stages, similarly to erythroblasts, also resulted in an activation of p53. By mating a null allele of *Trp53* into our mouse model of *Smarca5* conditional deletion we observed a very mild improvement of the phenotype. We therefore concluded that activation of p53 signaling pathway is not a major determinant of cell cycle arrest of Smarca5-null lymphocytes. Most prominent were changes in the expression profile of immature T lymphocytes that were markedly developmentally delayed as exemplified by the expression of earliest transcripts that were not silenced while transcripts belonging to more mature stages were not induced. These data thus strongly suggest that Smarca5 plays significant roles in setting the developmentally-specific gene expression pattern. This possibility we next explored further in detail to study genes regulated by a major epigenetic transcription factor called CTCF. We found that SMARCA5 regulates recruitment of CTCF on DNA near *SPI/PU.1* gene to temporally repress its expression during myelopoiesis. We think that this mechanism might be hijacked by acute myeloid leukemia cells in blocking the myeloid differentiation pattern of gene expression. In conclusion our data revealed that the ISWI ATPase Smarca5 has substantial yet not known

## **Keywords**

---

indispensable roles in early hematopoietic and lymphoid development to guide gene expression of differentiation control.

## **4 Keywords**

Chromatin, Hematopoiesis, Smarca5, Snf2h, p53, AML, CTCF, ISWI

### 5 Seznam zkratek

ACF	Komplex remodelující chromatin, který se skládá z proteinů Smarca5 a Acf1 (ATP-utilizing Chromatin Assembly and Remodeling Factor)
AML	Onemocnění krvetvorby ( <b>A</b> kutní <b>m</b> yeloidní <b>l</b> eukémie)
ATP	Adenosin trifosfát
bp	Párů bazí ( <b>b</b> ase <b>p</b> air). Označuje počet nukleotidů v sekvenci DNA.
BrdU	Analog tymidinu, který se inkorporuje do DNA v průběhu S fáze buněčného cyklu (5- <b>b</b> romo-2'- <b>d</b> eoxy <b>u</b> ridin)
Brg1	ATP- závislý chromatin remodelační factor, který patří do proteinové rodiny SWI/SNF
cDNA	Komplementární (complementary) DNA k mRNA
CHD	Název jedné z podrodin patřících do proteinové rodiny SWI2/SNF, jinak také označovaná jako Mi-2 ( <b>C</b> hromodomain and <b>H</b> elicase-like <b>D</b> omain)
Chd4	Na ATP závislý chromatin remodelační factor, který patří do proteinové rodiny CHD ( <b>C</b> hromodomain- <b>h</b> elicase- <b>D</b> NA-binding protein 4)
CLL	Hematologické onemocnění ( <b>C</b> hronic <b>L</b> ymfoid <b>L</b> eukemia)
CTCF	Transkripční faktor ( <b>C</b> CC <b>T</b> C-binding factor)
Cre/LoxP	Jedná se o technologii umožňující specificky rekombinovat sekvenčně označené úseky DNA. V případě např. delece genu je nutné nejprve daný gen (nebo nějaký z jeho protein kódujících exonů) na jeho začátku a konci molekulárně označit vložím tzv. loxP míst. Tyto 34bp dlouhé sekvence jsou následně rozeznány rekombinázou Cre a rekombinovány. Pokud sekvence loxP míst je čtena ve stejném směru, pak úsek mezi těmito místy bude vyštěpen. Pokud sekvence loxP míst budou vůči sobě v obrácené orientaci, nedojde k vyštěpení označeného úseku DNA, ale pouze k jeho převrácení vůči původní orientaci.
DLBCL	Hematologické onemocnění ( <b>D</b> iffuse <b>L</b> arge <b>B</b> -cell <b>L</b> ymphoma)
DMSO	<b>D</b> imethylsulfoxid
DN	<b>D</b> vojitě <b>n</b> egativní stádia thymocytů. Pro tato časná vývojová stádia thymocytů je typická nízká nebo žádná povrchová exprese koreceptorových molekul CD4 a CD8
DNA	Deoxyribonukleová kyselina ( <b>D</b> eoxyribonucleic <b>A</b> cid)
DP	<b>D</b> vojitě <b>p</b> ozitivní stádium thymocytů. Buňky tohoto vývojového stádia exprimují na svém povrchu současně obě koreceptorové molekuly CD4 a CD8
EdU	Analog tymidinu, který se inkorporuje do DNA v průběhu S fáze buněčného cyklu (5- <b>e</b> thynyl-2'- <b>d</b> eoxy <b>u</b> ridin)
FACS	Fluorescenčně-aktivované třídění buněk ( <b>F</b> luorescence <b>A</b> ctivated <b>C</b> ell <b>S</b> orting)
FL	Hematologické onemocnění ( <b>F</b> ollicular <b>L</b> ymphoma)

## Seznam zkratk

---

gDNA	<b>G</b> enomická <b>d</b> eoxyribonukleová kyselina
GFP	Zelený fluorescenční protein ( <b>G</b> reen <b>F</b> luorescent <b>P</b> rotein)
HSC	Krvetvorná kmenová buňka ( <b>H</b> ematopoietic <b>S</b> tem <b>C</b> ell)
ChIP	<b>C</b> hromatinová <b>I</b> munoprecipitace
CHRAC	Komplex remodelující chromatin, který se skládá z proteinů Smarca5, Acf1, CHRAC-15 a CHRAC-17 ( <b>C</b> hromatin <b>A</b> ccessibility <b>C</b> omplex)
INO80	Označení proteinové podrodiny katalytických podjednotek SWI2/SNF2 na ATP závislých chromatin remodelačních komplexu ( <b>I</b> nositol <b>R</b> equiring <b>80</b> )
i.p.	<b>I</b> ntraperitoneální
ISWI	Název jedné z podrodin patřících do proteinové rodiny SWI2/SNF2. Název podrodiny je odvozen podle společného orthologu proteinů Smarca5 a Smarca1 v <i>D. melanogaster</i> ( <b>I</b> mitation <b>M</b> ating <b>T</b> ype <b>S</b> witch)
LSK	Velmi časný vývojový stádium krvetvorby. Jedná se především o buňky kostní dřeně popřípadě fetálních jater, které jsou negativní na liniově specifické markery (Lin <sup>-</sup> ) a pozitivní na povrchové molekuly Sca a c-Kit (Lin <sup>-</sup> Sca <sup>+</sup> c-Kit <sup>+</sup> ). Toto stádium obsahuje krvetvorné kmenové buňky schopné obnovit krvetvorbu u vhodných recipientů.
MCL	Hematologické onemocnění ( <b>M</b> antle <b>C</b> ell <b>L</b> ymphoma)
MDS	Onemocnění krvetvorby ( <b>M</b> yelodysplastický <b>s</b> yndrom)
MEL	Buněčná linie, která byla odvozena ze slezin myši infikovaných virem FV-P (Friend erythroleukemia virus). Jedná se o linii myších leukemických proerytroblastů ( <b>M</b> ouse <b>E</b> rythroleukemia <b>C</b> ells)
MLP	Vývojové stádium krvetvorby ( <b>M</b> ultilymfoidní <b>p</b> rogenitor)
MM	Hematologické onemocnění ( <b>M</b> ultiple <b>M</b> yeloma)
MPP	Vývojové stádium krvetvorby ( <b>M</b> ultipotentní <b>p</b> rogenitor)
mRNA	<b>M</b> ediátorová (messenger) ribonukleová kyselina
NHEJ	<b>M</b> echanismus oprav dvojřetězcových zlomů na DNA ( <b>N</b> on- <b>H</b> omologous <b>E</b> nd <b>J</b> oining)
NoRC	Komplex remodelující chromatin, který se skládá z proteinů Smarca5 a Tip5 ( <b>N</b> ucleolar <b>R</b> emodeling <b>C</b> omplex)
OCI-M2	Buněčná linie, která byla odvozena z pacienta s diagnostikovanou erytroleukémií (AML-M6). Toto onemocnění vzniklo u tohoto pacienta sekundárně z MDS.
PBS	Fosfátový pufr ( <b>P</b> hosphate <b>B</b> uffered <b>S</b> aline)
PCR	Polymerázová řetězová reakce ( <b>P</b> olymerase <b>C</b> hain <b>R</b> eaction)
PHD	Vazebná doména proteinů umožňující interakci s methylovanými lysiny histonů ( <b>P</b> lant <b>H</b> omeodomain)

## Seznam zkratk

---

PU.1	Transkripční faktor. Produkt genu <i>SPI1</i> . Jeden z hlavních regulátorů myeloidního a B-lymfocytárního vývoje
RAG	Jedná se o geny, které kódují enzymy účastníci se přeskupování genů pro imunoglobulinový receptor B-lymfocytů a T-buněčný receptor v průběhu jejich vyžívání ( <b>R</b> ecombination- <b>a</b> ctivating <b>G</b> enes)
RNA	Ribonukleová kyselina ( <b>R</b> ibonucleic <b>A</b> cid)
rRNA	<b>R</b> ibozomální ribonukleová kyselina
RSF	Komplex remodelující chromatin, který se skládá z proteinů Smarca5 a Rsf-1 ( <b>R</b> emodeling and <b>S</b> pacing <b>F</b> actor)
RT-qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce z reverzně transkribované mRNA ( <b>R</b> everse <b>T</b> ranscription <b>q</b> uantitative <b>P</b> olymerase <b>C</b> hain <b>R</b> eaction)
SATB1	<b>S</b> pecial <b>A</b> T-rich sequence <b>B</b> inding protein <b>1</b>
siRNA	<b>S</b> mall <b>I</b> nterfering <b>R</b> NA
Smarca1	Faktor remodelující chromatin závislý na ATP, který tvoří katalytickou podjednotku ISWI komplexů ( <b>S</b> WI/ <b>S</b> NF Related, <b>M</b> atrix Associated, <b>A</b> ctin Dependent <b>R</b> egulator of <b>C</b> hromatin, Subfamily <b>a</b> , Member <b>1</b> )
Smarca5	Faktor remodelující chromatin závislý na ATP, který tvoří katalytickou podjednotku ISWI komplexů ( <b>S</b> WI/ <b>S</b> NF Related, <b>M</b> atrix Associated, <b>A</b> ctin Dependent <b>R</b> egulator of <b>C</b> hromatin, Subfamily <b>a</b> , Member <b>5</b> )
Snf2h	viz. Smarca5 ( <b>S</b> ucose <b>N</b> onfermenting <b>2</b> <b>H</b> omolog)
Snf2l	viz. Smarca1 ( <b>S</b> ucose <b>N</b> onfermenting <b>2</b> <b>L</b> ike)
SWI/SNF	Označení proteinové podrodiny katalytických podjednotek SWI2/SNF2 na ATP závislých chromatin remodelačních komplexů ( <b>M</b> ating <b>T</b> ype <b>S</b> witch/ <b>S</b> ucose <b>N</b> onfermenting)
TCR	Buněčný receptor T-lymfocytů ( <b>T</b> -cell <b>R</b> eceptor)
Tip5	Protein vyskytující se spolu se Smarca5 v komplexu NoRC ( <b>T</b> ranscription <b>T</b> ermination <b>F</b> actor 1 ( <b>T</b> tf1) – <b>I</b> nteracting <b>P</b> rotein 5)
Trp53	Název myšího genu ( <b>T</b> ransformation <b>R</b> elated <b>P</b> rotein <b>53</b> )
TSS	Místo transkripčního počátku ( <b>T</b> ranscription <b>S</b> tart <b>S</b> ide)
URE	Regulační oblast, která řídí transkripci genu <i>SPI1/PU.1</i> ( <b>U</b> pstream <b>R</b> egulatory <b>E</b> lement)
<i>Vav1</i>	Jedná se o gen, který je exprimovaný velmi časně v krvetvorbě a ve většině vývojových stádií. Tento gen kóduje tzv. faktor vyměňující GTP ( <b>G</b> uanine <b>N</b> ucleotide <b>E</b> xchange <b>F</b> actor - <b>GEF</b> )

## Seznam zkratk

---

V(D)J	Označuje genové úseky, které kódují variabilní části imunitních receptorů B- a T-lymfocytů. Těžký řetězec imunoglobulinu B-lymfocytů a $\beta$ -podjednotka TCR obsahují genové úseky VDJ. Lehký řetězec imunoglobulinu B-lymfocytů a $\alpha$ -podjednotka TCR obsahují VJ úseky ( <b>V</b> - variability; <b>D</b> - diversity; <b>J</b> - joining)
WICH	Komplex remodelující chromatin, který se skládá z proteinů Smarca5 a WSTF ( <b>W</b> STF- <b>I</b> SWI <b>C</b> hromatin Remodeling Complex)
WSTF	Protein vyskytující se spolu se Smarca5 v komplexu WICH, gen pro tento transkripční faktor je jedním z deletovaných genů u Williamsova syndromu ( <b>W</b> illiams <b>S</b> yndrome <b>T</b> ranscription <b>F</b> actor)
wt	Genový produkt (protein) nemutované alely. Jedinec s původním fenotypem. ( <b>W</b> ild <b>T</b> ype)

## 6 Literární přehled

### 6.1 Úvod

Krvetvorba je mnohostupňovitý proces, na jehož počátku je hematopoetická kmenová buňka se schopností buď obnovovat samu sebe či diferenciovat a vytvářet progenitory funkčně odlišných krevních elementů jako jsou např. erytrocyty, trombocyty, myelocyty a lymfocyty. Pro maturaci hematopoetických progenitorů do jednotlivých krevních elementů je charakteristické, že se aktivují liniově specifické genové exprese a dochází k dynamickým změnám komplexu DNA, proteinů a též RNA celkově označované jako chromatin. Předpokládá se, že narušení správné regulace chromatinové struktury, tedy odhalování a zahalování určitých sekvencí DNA, hematopoetickými kmenovými buňkami a progenitory může vést až k nastavení nevhodné genové exprese vyúsťující v nádorovou transformaci a to v podstatě na kterémkoliv stupni vývoje krevních buněk. Současné studie naznačují, že se nádorových i vývojově asociovaných změn struktury chromatinu může účastnit i faktor chromatinové přestavby: ISWI ATPáza Smarca5 (1, 2).

V následujících odstavcích bude nejprve popsán význam chromatinové struktury a její regulace proteinem Smarca5 v kontextu různých biologických dějů na úrovni buňky (např. replikace, transkripce, opravy DNA). Poté budou zmíněny unikátní myší modely s delecí genu *Smarca5* a jeho interakčních partnerů, které se využívají pro popis tkáňově specifických funkcí chromatin remodelačních komplexů. Stručně bude nastíněna krvetvorba u myší a v závěru literárního přehledu se objeví přehled nádorových onemocnění, s jejichž patogenezí je ISWI ATPáza Smarca5 asociována.

### 6.2 Chromatinová struktura a mechanismy její remodelace

Dvoušroubovicová molekula DNA se nachází v jádře eukaryotní buňky v interakci s vazebnými proteiny a společně s nimi vytváří strukturu chromatinu. Tato struktura umožňuje vtěsnat i několik metrů dlouhý polynukleotidový řetězec genomu do jádra eukaryotní buňky o velikosti jednotek mikrometrů. Významný podíl na uspořádání DNA do struktury chromatinu mají histonové proteiny, které společně s DNA vytváří základní jednotku této struktury – nukleozóm. Je potřeba zmínit, že chromatinová struktura není pouze statický útvar tvořený nukleozómy, jež kondenzují a uchovávají DNA v jádře. Jedná se o velice dynamickou strukturu, která se může měnit např. s průběhem buněčného cyklu, kdy v případě buněčného

dělení pozorujeme kondenzaci mitotických chromozomů a následně jejich segregaci do dceřiných buněk. Obecně poziční změny nukleozomů na vlákne DNA můžeme pozorovat i v promotorových oblastech genů, kde tyto lokální změny chromatinové struktury mohou souviset se změnami genové exprese. Všechny buněčné procesy v jádře jako například transkripce, replikace a opravy DNA probíhají ve struktuře chromatinu a existují lokální i globální mechanismy, které mohou tuto strukturu měnit.

Nukleozóm, základní jednotka chromatinu, nukleozóm, je tvořen proteinovým jádrem z histonových molekul – H2A, H2B, H3, H4, které je obtočeno přibližně 147 páry nukleotidových bazí DNA (3). Pojící úsek DNA, jenž propojuje dva sousedící nukleozómy se, nazývá linker. Délka linkeru (od 10 do 90 nukleotidů) se může dynamicky měnit např. v závislosti na stupni diferenciaci buňky a odrážet tak funkční stav chromatinu (4). Dále může být úsek linkeru rozeznán histonem H1, který má stabilizační efekt na uspořádání chromatinu do vyšších stupňů jeho organizace (5). Histony nukleozomového jádra mohou díky svému vysokému obsahu bazických aminokyselin zejména lyzinu a argininu prakticky bez závislosti na nukleotidové sekvenci interagovat se záporně nabitými fosfátovými skupinami DNA (3). Každý z těchto histonů je tvořen globulární doménou a nestrukturovaným peptidem na N konci molekuly (histony H2A a H2B mají také nestrukturované C konce). Tyto velice flexibilní histonové „ocásky“ (angl. „histone tails“), přestože nemají uspořádanou strukturu, obsahují podobně jako globulární domény, bazické aminokyseliny, které mohou interagovat se záporně nabitou fosfátovou kostrou DNA a stabilizovat tak dále strukturu nukleozomu. V eukaryotních buňkách pozorujeme četné enzymatické aktivity, které specificky posttranslačně modifikují aminokyselinové zbytky histonových ocásků. Jedním z příkladů takovéto posttranslační modifikace, kterou pozorujeme především v rozvolněné struktuře euchromatinu např. v již zmíněných promotorových oblastech aktivně transkribovaných genů, je acetylace lyzinu (6). Tato modifikace umožňuje odstínit kladný náboj aminokyseliny a narušit tak stabilitu vazby histonu s DNA popř. mezihistonových interakcí. Další příkladem posttranslační modifikace, kterou můžeme pozorovat, jak v oblastech euchromatinu, a dále i v oblastech kondenzované, transkripčně neaktivní struktury heterochromatinu, je methylace. Tato modifikace lyzinu (popř. argininu) nemění náboj aminokyseliny a je proto nepravděpodobné, aby její přítomnost v molekule peptidu měla vliv na interakce založené na rozdílu v náboji. Význam methylace je především v označení histonů pro vazbu nehistonových proteinů, které s sebou mohou do specifického místa chromatinu přinést další enzymatické aktivity schopné remodelovat jeho strukturu. Ukazuje se, že specifita rozeznání nehistonovými proteiny je dosažena především specifickým sledem posttranslačních modifikací, který je někdy označován jako „histonový



kód“ (7). Do dnešní doby bylo popsáno přibližně 60 aminokyselinových zbytků podléhajících posttranslační modifikaci s různými mechanizmy jejich působení na strukturu chromatinu a více jak 8 různých druhů modifikací – mimo acetylace a methylace jsou to např. fosforylace serinu a threoninu, ubiquitinace lysinu, citrulinace, ADP ribosylace a SUMOylace. Posttranslačního modifikování histonových ocásků je jedním ze základních mechanismů regulace chromatinové struktury.

Vytvoření nukleozomů a chromatinové struktury s sebou přináší problém přístupnosti DNA ostatním vazebným faktorům. Fyzická přítomnost histonů na vlákne DNA a silná interakce mezi histonovými proteiny a DNA, omezuje schopnost vazebných faktorů především rozeznat a vázat specifické sekvence DNA. Základní buněčné procesy, jež probíhají na chromozomech jako např. replikace, transkripce, opravy DNA a rekombinace, jsou proto velice závislé na lokální chromatinové struktuře v místech probíhajícího procesu. V eukaryotních buňkách můžeme pozorovat dva mechanismy, jakým mohou buňky měnit lokální strukturu chromatinu a tím i regulovat základní biologické procesy. Prvním z nich jsou zmíněné enzymatické aktivity schopné posttranslační modifikace histonů a regulace histonového kódu. Druhý z mechanismů zajišťují ATP závislé chromatin remodelující faktory, které pro přerušení nekovalentních vazeb mezi DNA a histony využívají energii z hydrolýzy ATP. Z popsaných mechanismů těchto faktorů remodelovat chromatin je např. schopnost odstraňovat, destabilizovat, restrukturalizovat nukleozomy, dále pak nukleozomy *de novo* vytvářet (angl. nucleosome assembly) nebo jimi pohybovat oběma směry podél vlákna DNA (angl. nucleosome sliding) (8). Schopnost remodelace chromatinu těmito proteinům propůjčuje především velice evolučně konzervovaná helikázová doména DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His), která umožňuje pro tuto činnost získávat energii z hydrolýzy ATP (funkce ATPázy). První zástupce remodelačních faktorů s doménou DEAD/H byl objeven u kvasinek při hledání genů, jejichž mutování mělo vliv na tzv. přepínání párovacího typu (angl. Mating type switching, SWI) a na růst kvasinek v prostředí, kde pro ně hlavním zdrojem uhlíku byla sacharóza (angl. sucrose non-fermenting, SNF) (9). Tento protein dal posléze název i celé proteinové nadrodině chromatin remodelačních faktorů - SWI2/SNF2. V současnosti tato nadrodina ATPáz sestává ze čtyř základních podrodin (ISWI, SWI/SNF, CHD, INO80), jejichž zástupci se od sebe liší především složením jednotlivých funkčních domén v molekule peptidu (10, 11). V literárním přehledu této práce se budu dále zabývat pouze chromatin remodelačními faktory z (pod)rodiny ISWI, kdy nejprve popíši jejich biologické funkce na úrovni buňky a následně zmíním význam ISWI proteinů pro vývoj tkání a celého organismu.

### 6.3 ATPázy ISWI a jejich struktura

U savců můžeme nalézt dva homology podrodiny ISWI a to geny *Smarca5* a *Smarca1*, které jsou orthology kvasinkových genů *Isw1* a *Isw2* (12). Tyto ATPázy mají velikost přibližně 122 kDa a sekvence aminokyselin, kterou jsou tvořeny, je mezi oběma molekulami téměř z 80% identická. V blízkosti ATPázové domény leží u těchto enzymů dva autoregulační motivy, které strukturně propojují hydrolyzu ATP s posunem DNA (NegC) a inhibují hydrolyzu ATP (AutoN) v případě, že ISWI protein není v interakci s chromatinem (13). Autoregulační motivy tak slouží ISWI ATPázám především pro zvýšení specifity a správnému načasování hydrolyzy ATP. Proteiny ISWI dále charakterizují C-koncově lokalizované domény HAND, SANT (*S*wi3 *A*da2 *N*-CoR *T*FIIB) a SLIDE (*S*ANT-like *I*SWI *d*omain), které slouží k rozeznání substrátu a pro protein-proteinové interakce. Tyto domény například umožňují vazbu s nestrukturovanými konci histonů H3 a H4 a usnadňují interakci s DNA vázanou v nukleozomech i mimo ně viz. obrázek č.1 (14-16). Další vlastností HAND-SANT-SLIDE domén je, že umožňují ISWI ATPázám interagovat s různými nekatalytickými vazebnými partnery, s nimiž vytváří tzv. chromatin remodelační komplexy.

### 6.4 Chromatin remodelační komplexy, které obsahují ATPázy ISWI

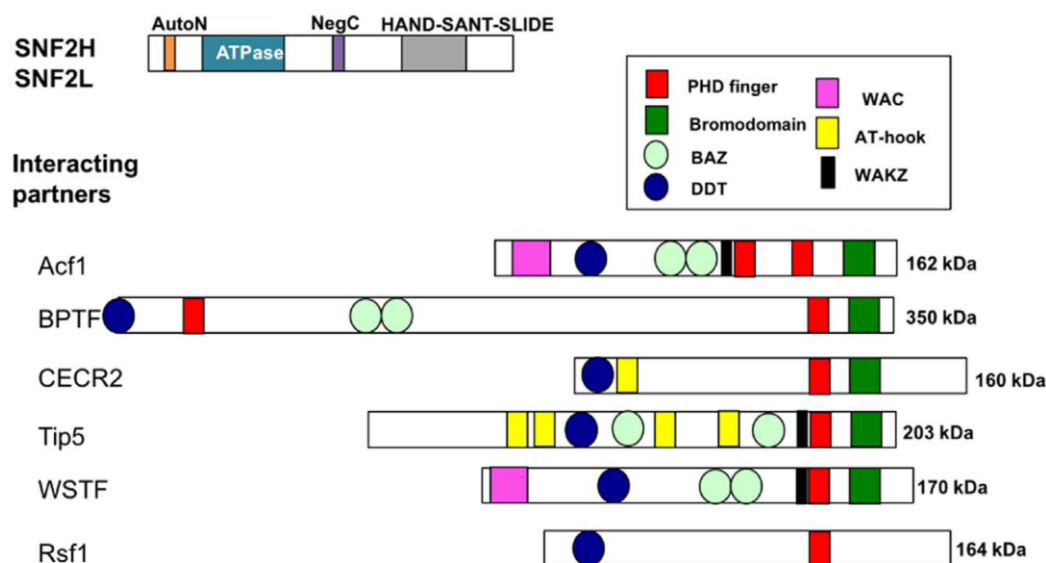
Remodelační komplexy, které obsahují ATPázu z podrodiny ISWI jsou obvykle heterodimery viz. tabulka č.1. Protein *Smarca5* může být součástí až sedmi remodelačních komplexů – jmenovitě ACF (ATP-utilizing chromatin assembly and remodeling factor), CHRAC (chromatin accessibility complex), WICH (Williams syndrome transcription factor-imitation switch), B-WICH, RSF (remodeling and sparing factor), NoRC (Nucleolar remodeling komplex) a *Smarca5*-kohezinový komplex. Protein *Smarca1* byl nalezen jako součást dvou remodelačních komplexů - NURF (Nucleosome remodeling factor) a CERF (CECR2-containing remodeling factor). V současnosti se ukazuje, že vzhledem k vysoké míře podobnosti obou ISWI proteinů, mohou tyto ATPázy zřejmě interagovat se stejnými vazebnými partnery a mohou tvořit podobné remodelační komplexy (17). Tuto hypotézu podporuje pozorování v myších testes, kde protein *Cecr2* přednostně vytváří remodelační komplex CERF se *Smarca5* (18). Existuje předpoklad, že zastoupení jednotlivých remodelačních komplexů v buňce je dán především individuální mírou exprese ISWI ATPáz a jejich nekatalytických vazebných partnerů (17). A tak například v myších testes, kde je gen *Smarca5* exprimován ve výrazně vyšší míře než gen *Smarca1* (12), pravděpodobně budeme pozorovat vyšší relativní zastoupení remodelačních komplexů CERF obsahujících protein *Smarca5* oproti *Smarca1*.

Funkcí vazebných partnerů v remodelačních komplexech je především stimulovat, regulovat nebo dále měnit substrátovou specifitu ISWI ATPázy (19). Například nekatalytické podjednotky z proteinové rodiny BAZ (Baz1a/Acf1, Baz1b/Wstf a Baz2a/Tip5), které interagují s proteinem Smarca5 skrze podoblast jeho domény SLIDE zvanou AID (ACF interacting domain) (20), obsahují ve své molekule ještě PHD finger doménu a bromodoménu (viz. obrázek č.1). Tyto motivy schopné rozeznat posttranslační modifikace histonů dále rozšiřují schopnost ISWI proteinů „číst“ histonový kód a zároveň jim umožňují měnit jejich chromatinovou lokalizaci a účast v odlišných biologických procesech (21). Díky vazebným partnerům tak mohou ISWI proteiny zastávat různé biologické role, které se odvíjí od toho, s jakou partnerskou molekulou jsou momentálně v komplexu. Mezi hlavní buněčné procesy, kterých se ISWI komplexy účastní, a které budou do větší podrobnosti probrány v následujících odstavcích, jsou regulace transkripce, replikace DNA, opravy poškozené DNA, a udržování globální struktury chromozomů.

Composition of the known mammalian ISWI complexes.

Complex	ISWI (gene/protein)	Non-catalytic interacting partners (gene/protein)
ACF	<i>Smarca5/Snf2h</i>	<i>Baz1a/Acf-1</i>
CHRA1	<i>Smarca5/Snf2h</i>	<i>Baz1a/Acf1; Chrac1/Chrac15; Pole3/Chrac17</i>
NoRC	<i>Smarca5/Snf2h</i>	<i>Baz2a/Tip5</i>
RSF	<i>Smarca5/Snf2h</i>	<i>Rsf1/Rsf-1</i>
WICH	<i>Smarca5/Snf2h</i>	<i>Baz1b/Wstf</i>
SNF2H-cohesin	<i>Smarca5/Snf2h</i>	Rad21, SMC1/3, SA1/SA2, and proteins of NuRD complex proteins
CERF	<i>Smarca1/Snf2l</i>	<i>Cecr2/Cecr2</i>
NURF	<i>Smarca1/Snf2l</i>	<i>Bptf/Bptf; Rbbp7/RbAp46; Rbbp4/RbAp48</i>

**Tabulka č.1:** Tato tabulka obsahuje seznam doposud známých chromatin remodelačních komplexů, které obsahují katalytickou podjednotku z rodiny ISWI (buď protein SMARCA5 nebo SMARCA1). Interakční partneři ISWI proteinů v těchto komplexech, jsou vyjmenovány v pravém sloupci. Převzato z publikace (22).



**Obrázek č.1:** Schematické znázornění proteinů z rodiny ISWI (horní část) a jejich interakčních partnerů z proteinové rodiny BAZ (dolní část). ISWI proteiny SMARCA5 (SNF2H) a SMARCA1 (SNF2L) mají z 80% stejnou sekvenci aminokyselin a obsahují identické funkční proteinové domény. Regulační motivy AutoN a NegC slouží především k inhibici hydrolýzy ATP (AutoN) a inhibici ATP závislé translokace (NegC) v případě, že není ISWI ATPáza v kontaktu se svým substrátem (13). Evolučně konzervovaná ATPázová doména a HAND-SANT-SLIDE motivy jsou také vyobrazeny. Struktura partnerských proteinů z rodiny BAZ (Baz1a/Acf1, Baz1b/Wstf a Baz2a/Tip5) a jejich příbuzných molekul je ukázána v dolní části obrázků včetně jejich molekulárních velikostí. BAZ domény slouží pro interakci s ISWI ATPázami. Bromodoména je vazebný motiv, který slouží pro rozeznání acetylovaných lyzinů na nestrukturovaných koncích histonů (23). U PHD finger (Plan homeodomain) domén se předpokládá, že zprostředkovávají kontakt s dalšími proteiny a v koordinaci s bromodoménou zřejmě umožňují rozeznání histonových modifikací např. H4K16Ac (20, 24, 25). WAC motiv je nutný pro efektivní vazbu BAZ-ISWI komplexů na DNA (26). AT-kotva a DDT domény také pravděpodobně usnadňují partnerským molekulám ISWI ATPáz vazbu k DNA (27). Obrázek převzat z publikace (22).

### 6.5 Role proteinů ISWI v regulaci transkripce

Diferenciace progenitorů je doprovázena velkými změnami v genové expresi, kdy se umlčují geny typické pro časný vývoj a současně se spouští exprese tkáňově-specifických genů charakteristických pro terminálně diferenciovaná stadia. Těmto změnám v genové expresi vždy předchází i lokální změny chromatinové struktury na úrovni jednotlivých genů. Moderní metody sekvenace DNA fragmentů získaných metodou chromatinové imunoprecipitace (ChIP-seq) naznačují, že účast ISWI proteinů v lokální regulaci exprese může být jednou z jejich hlavní funkcí. Tato metoda byla poprvé využita k celogenomovému určení míst vazby ISWI proteinů u zvířecích modelů octomilky a myši (28, 29). Bylo zjištěno, že v případě octomilky se protein ISWI (na rozdíl od savců, u kterých se vyskytují dva ISWI proteiny, má octomilka

pouze jeden homolog) objevuje především v oblastech kódujících genů (925 míst z 1176 identifikovaných) a to preferenčně v místech jejich regulačních oblastí přibližně 300 bp za transkripčním startem (29). Podobné výsledky byly dosaženy i u myši. Téměř 60% všech míst genomu, ve kterých se savčí ortholog ISWI (protein Smarca5) vyskytoval, tvořily genové oblasti a z toho více jak polovinu tvořily jejich promotory (28). Statisticky nejvýznamněji se pak protein Smarca5 vázal do sekvence, která odpovídala vazebnému konsenzu transkripčního faktoru CTCF (35% všech míst) (28). Jak už bylo nastíněno v předchozím odstavci, chromatin remodelačními faktorům obvykle schází vnitřní schopnost rozeznat specifické sekvence DNA. Do míst jejich potřeby jsou pak cíleny sekvencně specifickými DNA vazebnými proteiny nebo postranlačními modifikacemi histonů. Biochemické studie na lyzátech buněk HeLa ukázaly, že je protein SMARCA5 schopen vázat se na di- a tri-methylované histony H3 na lyzinu 4 (30). Také u partnerských molekul proteinů ISWI byla prokázána schopnost vázat modifikaci H3K4Me3 svojí PHD finger doménou (komplex NURF) a dále acetylaci H3K16Ac svojí bromodoménou (komplex NoRC) (25, 31, 32). Popsané histonové modifikace se objevují především na 5' konci transkripčně aktivních genů (7), což dále podtrhuje význam chromatin remodelačních komplexů ISWI v regulaci transkripce a zřejmě i vysvětluje jejich přítomnost v oblastech kolem transkripčních startů.

Jakým způsobem, ale chromatin remodelační faktory (pod)rodiny ISWI regulují genovou expresi? V regulaci genové exprese (ať už inhibiční nebo aktivační) se zřejmě využívá jejich vlastnost posouvat nukleozomy podél vlákna DNA např. v promotorových oblastech, kde poziční změny nukleozomů přímo souvisejí s transkripční aktivitou genů (33). Dalším způsobem, jak mohou tyto komplexy regulovat genovou expresi, je heterochromatinizovat DNA sekvence (34), jejichž exprese by byla pro buňku nepotřebná nebo nežádoucí a heterochromatinovou strukturu dále udržovat (35-37). Nejpodrobněji byla role v regulaci transkripce popsána u komplexů ACF, WICH, NoRC a NURF (obrázek č.2). Poznatky týkající se těchto komplexů budou v následujících odstavcích podrobně rozepsány.

Komplex ACF tvoří dvě podjednotky – katalytickou část tvoří protein Smarca5 a nekatalytickou protein Acf1/Baz1a (38). Obvyklý způsob, kterým se studuje funkce chromatin remodelačních komplexů v buňkách je pozorování rozdílů mezi kontrolní buněčnou linií a stejnou linií po depleci ISWI ATPázy nebo jejího interakčního partnera. Například u farmakologicky aktivované myši linie T buněčného lymfomu EL4, byla po depleci proteinu Smarca5 pozorována zvýšená hladina mRNA pro interleukin-2 (IL-2), IL-5, IL-13 a IL-17A (39). Deplece Smarca5 dále vyvolala snížení transkriptu pro IL-3, což může naznačovat význam tohoto proteinu v aktivaci a současně i represí liniově specifické genové exprese. Autoři této

práce dále ukázali, že ve studovaných genech se protein Smarca5 vyskytuje společně s vazebným partnerem Acf1 a odvodili, že společný komplex obou proteinů (komplex ACF) zřejmě přímo reguluje expresi zmíněných cytokinů (39). Komplex ACF se dále účastní regulace genů, jejichž exprese je reprimována korepresorem jaderných receptorů N-CoR (angl. the nuclear receptor corepressor) (40, 41). Korepresor N-CoR interaguje s jadernými receptory II. třídy (např. receptor pro thyroidní hormon nebo vitamin D3) v době, kdy příslušný receptor postrádá svoji molekulu ligandu a aktivně blokuje transkripci jeho responzivních genů. Ukazuje se, že do promotoru reprimovaných genů přináší N-CoR společně s histonovou deacetylázou 3 (HDAC3) i chromatin remodelační faktor Smarca5 a jeho partnerskou molekulu Acf1 (40, 41). Oba proteiny (Smarca5 i Acf1) zde pomáhají udržovat transkripčně represivní stav chromatinu, protože v případě jejich deplece se indukuje exprese genů reprimovaných proteinem N-CoR. Podobně i navázání molekuly ligandu na jaderný receptor doprovází uvolnění proteinu Acf1 (komplex ACF) z promotorových oblastí reprimovaných genů a objevují se změny ve struktuře chromatinu, jež souvisí s aktivní transkripcí (41). Chromatin remodelační komplex ACF se tedy účastní aktivace a represe strukturních genů a může být spuštěna signály přicházející z vně buňky (např. hormonálně).

Komplex WICH tvoří dvě podjednotky – katalytickou část tvoří ATPáza Smarca5 a nekatalytickou protein Wstf/Baz1b (42). Tento chromatin remodelační komplex hraje důl roli ve vytváření a udržování struktury heterochromatinu (viz. dále). Pokud je „údržba“ hetrochromatinové struktury v důsledku ztráty WICH komplexu narušena, dochází k deregulaci exprese mnoha strukturních genů. Příkladem může být práce, ve které autoři použili k inaktivaci genu *WSTF* nukleázu fúзованou s DNA vazebnou doménou zinkového prstu (angl. ZNF-nuclease) (37). Delece genu *WSTF* u studovaných buněk RPE1 (imortalizovaná linie epitliálních buněk retiny) vyvolala signifikantní změny v expresi přibližně 515 transkripů (z celkem 45tis). Tato expresní data naznačila, že remodelační komplex WICH je zřejmě současně aktivátorem i represorem transkripce, protože ze zmíněných 515 transkriptů jich 173 bylo zvýšeno a 342 sníženo (37).

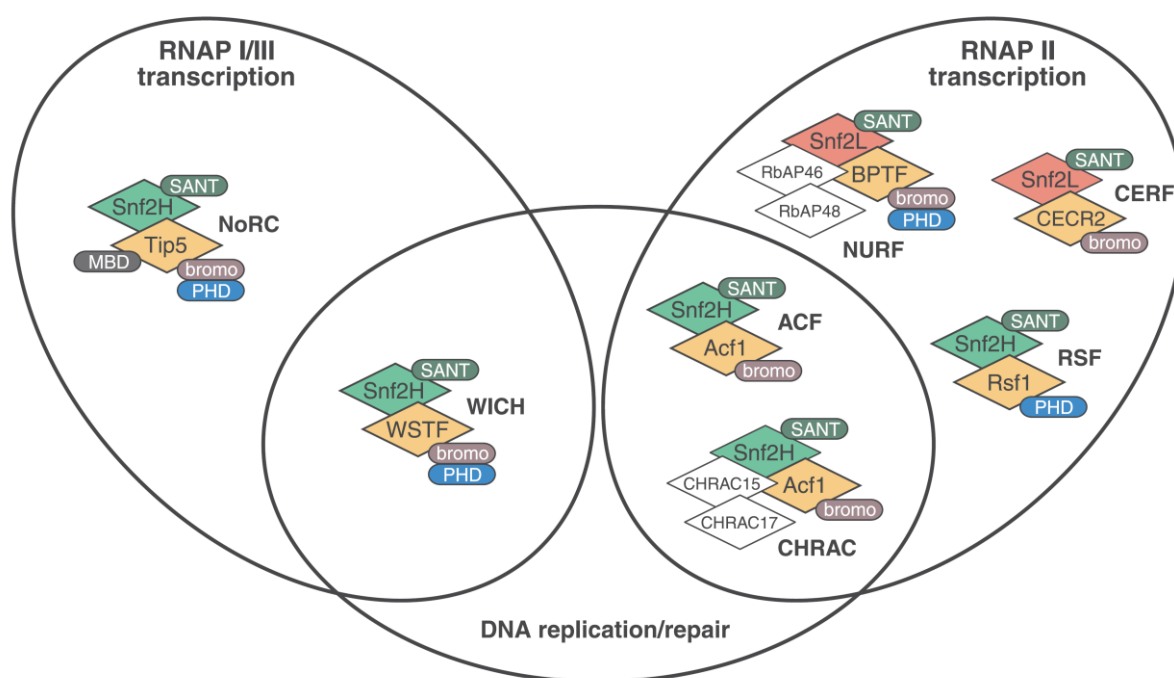
Z analýz buněčného extraktu buněk HeLa bylo zjištěno, že komplex WICH interaguje s dalšími šesti molekulami [faktorem sestřihu RNA - proteinem Sf3b155/SAP155, RNA helikázou II/Guα, transkripčním faktorem Mybbp1a (Myb-binding protein 1a), enzymem účastnícím se oprav DNA - proteinem CSB (Cockayne syndrome protein B) a protoonkogenem Dek] za vzniku mnoha-podjednotkového komplexu o molekulární hmotnosti 3 MDa, jež autoři nazvali B-WICH (43). Komplex B-WICH byl nalezen v oblasti genů přepisovaných RNA polymerázou III kódujících 5S rRNA a 7SL RNA. Data této práce naznačují, že chromatin

remodelační aktivita komplexu B-WICH má stimulační funkci pro transkripci genů přepisovaných touto polymerázou (43). Další práce ukázaly, že se může B-WICH účastnit regulace transkripce ribozomálních genů (rDNA) (44). Komplex B-WICH byl objeven v promotorové i kódující oblasti 45S RNA, kde asocioval s RNA polymerázou I. Podobně jako v případě RNA pol. III přepisovaných genů i zde pravděpodobně funguje jako stimulátor transkripce (44). V souhrnu, ISWI ATPáza Smarca5 může v komplexu WICH, podobně jako v komplexu ACF, regulovat transkripci strukturních genů přepisovaných RNA polymerázou II (37), zároveň ale může sloužit jako aktivátor (a represor současně viz. dále) nestrukturních genů přepisovaných RNA polymerázou III a I zřejmě v důsledku metabolických potřeb buňky.

Dalším chromatin remodelačním komplexem, který je schopen regulovat transkripci rDNA je proteinový komplex NoRC. Komplex NoRC je složený ze dvou podjednotek Smarca5 a Tip5/Baz2a. Původně byl tento komplex objeven v kolokalizaci s transkripčním faktorem, jež je specifický pro jadérko – proteinem UBF (angl. upstream binding factor) (45). Data následných prací ukázala, že komplex NoRC hraje v regulaci transkripce rDNA (45S RNA) opačnou úlohu než komplex B-WICH, tedy jako represor transkripce (46). Mechanismem této genové represe je vytvoření kódu typického pro heterochromatin např. hypoacetylace histonů H4, methylace DNA, methylace histonu H3 na lyzinu 9 (H3K9) v promotorech genů rDNA (25, 33, 46). Ukázalo se, že protein Tip5 vyžaduje pro vazbu do promotorových oblastí rDNA acetylovaný histon H4 na lyzinu 16 (H3K16Ac), který rozeznává svojí bromodoménou (25). Protein Tip5 pak do míst promotoru pro rDNA přináší chromatin remodelační faktor Smarca5, DNA methyl transferázy (DNMT1 a DNMT3) a histonové deacetylázy (HDAC1), které dále pomáhají vytvořit transkripčně neaktivní formu chromatinu (25). Epigenetické umlčování exprese rDNA genů komplexem NoRC je také doprovázeno posunem nukleozomů do pozic, které nejsou výhodné pro spuštění transkripce (33). NoRC je tedy komplex transkripčně inhibiční a k umlčování exprese rDNA využívá jednak svojí chromatin remodelační aktivitu a dále pak schopnost nepřímo měnit epigenetickou informaci uloženou v postranlačních modifikacích histonů a methylaci DNA.

Komplex NURF se skládá ze čtyř podjednotek – ATPázy Smarca1, nekatalytické podjednotky Bptf (angl. Bromodomain PHD finger transcription factor) a dvou proteinů asociovaných s proteinem retinoblastoma (RbAP48/46) (47). Studie využívající metodu DNA sekvenování pro studium celogenomové distribuce nukleozomů ukazují, že delece genu *Bptf* v makofázích octomilky vyvolá nukleozomální translokace v oblastech genových enhancerů, insulátorů a transkripčních startů transkripčně aktivních genů (48). Ukazuje se, že komplex NURF je do regulačních oblastí genů přinášěn společně s důležitými transkripčními faktory.

Podobně jako v případě ATPázy Smarca5 se protein Bptf (komplex NURF) vyskytuje v oblastech rozeznávaných transkripčním faktorem CTCF a kohezinem, kde společně s těmito proteiny zřejmě pomáhá regulovat tkáňově specifickou genovou expresi (49). Další práce ukazují, že protein Bptf interaguje s transkripčním faktorem c-Myc v promotorových oblastech jeho responzivních genů a pomáhá mu aktivovat jeho transkripční program (50). V souhrnu, chromatin remodelační komplexy podrodiny ISWI jsou významnými regulátory genové exprese a to jak strukturních, tak i protein nekódujících genů.



**Obrázek č.2:** Schematické znázornění chromatin remodelačních komplexů proteinové rodiny ISWI. Diagram rozděluje jednotlivé ISWI komplexy podle jejich buněčné funkce do třech kategorií: 1) komplexy, které se účastní oprav DNA a její replikace, 2) komplexy, které regulují transkripci protein kódujících genů RNA polymerázou II a 3) komplexy, které se účastní regulace exprese genů transkribovaných RNA polymerázami I a III. Převzato z (51).

### 6.6 ISWI komplexy v remodelaci chromatinu v průběhu replikace DNA

Replikace je proces, který využívá aktivitu chromatin remodelačních komplexů nejen pro snazší průchod replikačního aparátu skrze strukturu chromatinu, ale také pro zdvojení epigenetické informace mezi obě nově vznikající vlákna DNA. Epigenetická informace ukrytá v posttranslačních modifikacích histonových N-konců a v rozmístění nukleozomů na DNA musí být replikována podobně jako genetická informace, aby byla zachována liniově specifická exprese genů, diferenciační status buňky a integrita genomu (52). Procesu replikace se účastní



chromatin remodelační komplexy ACF a WICH (obrázek č.2) a oba komplexy v něm mají zřejmě odlišnou úlohu. Například snížení exprese proteinů ACF1 a SMARCA5 v buňkách HeLa zpomaluje jejich buněčný cyklus a inhibuje replikaci vysoce kondenzovaných oblastí chromatinu především centromer v pozdní části S fáze buněčného cyklu (53). Zajímavé je, že po aplikaci hypometylačního činidla 5-aza-2-deoxycytidinu, který částečně „dekondenzuje“ heterochromatin těchto oblastí, dochází ke zrušení inhibice replikace. Popsaná data naznačují, že je komplex ACF v místech probíhající replikace důležitý především pro otevírání vysoce kondenzovaných heterochromatinizovaných sekvencí DNA (53).

Komplex WICH se podobně jako komplex ACF objevuje v heterochromatinu pericentromerických oblastí v době, kdy jsou tyto oblasti replikovány tedy v průběhu střední, pozdní a velmi pozdní S fáze buněčného cyklu (42, 54). Experimenty v buňkách HeLa ukázaly, že do míst replikace je komplex WICH cílen skrze přímou vazbu s helikázou PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (54). Umlčení exprese proteinu WSTF v experimentální buněčné linii vedlo ke globálnímu nabohacení chromatinu heterochromatinovým proteinem 1 (HP1) a histonovými modifikacemi, které jsou specifické pro heterochromatin (např. H3K9Me3, H3K27Me2). Vzhledem k tomu, že popsaná globální heterochromatinizace byla pozorována až po replikaci, autoři usuzovali, že komplex WICH slouží především ke kopírování a udržování otevřené struktury chromatinu nově replikované DNA (54).

Protein Smarca5 (příslušnost ke zmíněným chromatin remodelačním komplexům nebyla popsána) se zřejmě účastní i remodelace chromatinové struktury v oblasti replikačních počátků v průběhu G1 fáze buněčného cyklu (55). Bylo ukázáno, že je tato ATPáza do míst replikačních počátků přinášena proteinem Cdt1 (Cdc10-dependent transcript 1) a svojí remodelační aktivitou zde usnadňuje nasedání MCM (minichromosome maintenance) proteinů pro efektivní vznik pre-replikačního komplexu. Autoři dále pozorovali (podobně jako u komplexů ACF a WSTF) zpomalení S fáze buněčného cyklu po depleci Smarca5 (55). Přítomnost proteinu Smarca5 byla dále prokázána i v případě virových (herpes simplex virus 1) nebo z virů odvozených (Epstein-Barr virus) replikačních počátků a deplece této ATPázy ve virem infikovaných buňkách vedla ke snížení intracelulárního množství virové DNA a proteinů (56, 57).

V souhrnu výše popsané práce ukazují, že úloha proteinu Smarca5 a ISWI remodelačních komplexů v procesu replikace může být mnoha úrovněv. Od regulace přístupnosti chromatinové struktury replikačnímu aparátu, po účast ve vytvoření pre-replikačního komplexu v místech počátků replikace, až po obnovu chromatinové struktury a epigenetické informace následně po replikaci.

### 6.7 Vztah proteinů komplexů ISWI k opravám DNA

Vzhledem k nutnosti buněk uchovávat a přenášet genetický materiál v nezměněné podobě do dalších generací, vyvinuly se v evoluci mechanismy schopné rozeznat, označit a opravit poškození DNA. Souhrnně se tyto mechanismy označují jako odezva na přítomnost poškozené DNA v buňce (angl. DNA damage response - DDR). Pro DDR je zcela zásadní, aby byla remodelací zajištěna přístupnost chromatinové struktury v místě poškození DNA např. signálními molekulám, jež označí místo poškození a následně mechanismům, které poškozené místo na DNA opraví. Remodelace chromatinu se však uplatňuje i po úspěšném opravení místa poškozené DNA, kdy je nutné chromatinovou strukturu vrátit do původního stavu a regenerovat epigenetickou informaci (58). Protein SMARCA5 a jeho vazební partneři byli studováni především v opravách dvouvláknových zlomů DNA, které jsou zajišťovány dvěma enzymatickými drahami – homologní rekombinací (HR) a spojováním nehomologních konců DNA (NHEJ; angl. nonhomologous end-joining). Obou procesů oprav poškození DNA a celkově DDR se účastní stovky molekul. Vztahy jednotlivých molekul či mechanismy jejich vzájemného fungování jsou velice složité a nelze se s nimi vzhledem k limitovanému prostoru tohoto literárního přehledu dopodrobna zabývat. Popis ISWI komplexů v DDR proto bude omezen pouze na obecné informace, které se k nim vztahují.

Autoři většiny současných publikací, kteří se zabývají studiem komplexů ISWI v opravách poškozené DNA popisují, že lidské buněčné linie vykazují po depleci ATPázy SMARCA5 či jejich interakčních partnerů ACF1 a RSF1 výraznou citlivost ke genotoxickému stresu (59-63). Potlačení exprese zmíněných proteinů způsobuje výraznou citlivost buněk k dvouvláknovému přerušení DNA (vyvolané např. rentgenovým zářením či bleomycinem) v důsledku inhibice mechanismů, které tato poškození opravují (59-63). Ukazuje se, že se ISWI komplexy účastní oprav DNA přímo. Metodami fluorescenční mikroskopie, které umožňují studovat buněčnou lokalizaci proteinů a jejich dynamiku in vivo, bylo opakovaně ukázáno, že se podjednotky ISWI komplexů (např. proteiny ACF1, SMARCA5 a SMARCA1) akumulují v místech dvouvláknových zlomů společně s dalšími molekulami DDR a to velmi rychle, v řádech desítek vteřin po indukci poškození (62, 64). Jakou funkci v opravách DNA ISWI komplexy zastávají? Publikace popisují, že se zmíněnému narušení mechanismů oprav DNA po depleci podjednotek ISWI komplexů dá v mnoha případech předejít aplikací látek rozvolňujících chromatinovou strukturu (např. chlorochin, trichostatin A a hypotonický pufr) (60, 65, 66). Obecně se tedy dá říci, že ISWI komplexy hrají úlohu v otevírání chromatinu v místech poškození DNA. Toto tvrzení je ovšem velmi zjednodušené a pro detailní popis

funkcí proteinů ISWI v opravách DNA, které budou rozepsány v následujících odstavcích, bude nutné i stručně popsat vztahy mezi některými proteiny, jež se těchto oprav účastní.

Buněčná reakce na dvouvláknové poškození DNA směřuje především k aktivaci signálních drah, které zastaví buňku v dané fázi buněčného cyklu a dále k navázání proteinů oprav v místě, kde k přerušení DNA došlo. Jeden z prvních proteinových komplexů, který se v místě poškození utvoří, je komplex MRN (složen z proteinů Mre11, Rad50, Nbs1) a jeho úkolem je aktivovat protein kinázu ATM (angl. Ataxia telangiectasia mutated). Tato kináza následně fosforyluje stovky buněčných proteinů, které hrají úlohu jak v zástavě buněčného cyklu (např. p53), tak i v následných opravách dvouvláknových zlomů na DNA (viz dále). Jedním z nejdůležitějších cílů kinázy ATM je histonová varianta H2AX a fosforylace tohoto histonu na serinu 139 (označuje se jako  $\gamma$ H2AX) je typickým znakem chromatinu v místě poškození DNA (shrnutí (67)).

Histon H2AX za normálních okolností tvoří přibližně 20% histonů varianty H2A a 2% všech histonů v buňce (68). Ukazuje se, že možným mechanismem udržování takto relativně nízké intracelulární hladiny H2AX je jeho postranlační degradace v proteazomu (69). Degradace histonu H2AX je ovšem přerušena v okamžiku indukce poškození DNA a zdá se, že se tohoto procesu účastní i protein SMARCA5 včetně kinázy ATM a histonové deacetylázy SIRT6 (Sirtuin6) (69). SMARCA5 společně s proteinem SIRT6 zřejmě zajišťují inkorporaci H2AX do chromatinu v místech poškození DNA. Pro stabilizaci histonu H2AX a zastavení jeho degradace je nutná fosforylace na Ser 139, kterou zajišťuje ATM. (69).

Následně po fosforylaci kinázou ATM je histon  $\gamma$ H2AX rozeznáván proteinem MDC1, který slouží jako platforma pro interakci s dalšími proteiny např. s již zmíněným komplexem MRN-ATM (fosforyluje histony H2AX do vzdálenosti až stovek kilobází od místa poškození) nebo s E3 ubiquitin ligázami RNF8 a RNF168. Ubiquitin ligázy RNF8 a RNF168 pak spolu v kooperaci polyubiquitínují (tato modifikace nevede k degradaci v proteazomu) většinu variant histonu H2A (včetně H2AX) a podobně jako v případě  $\gamma$ H2AX se tato modifikace objevuje desítky kilobází od místa poškození DNA a slouží jako vazebná struktura pro interakci s dalšími proteiny oprav (např. BRCA1 či 53BP1) (70). Současné práce ukazují, že protein SMARCA5 může přímo interagovat s RNF168 v místě poškození DNA a zajišťovat akumulaci této ubiquitin ligázy v chromatinu (62). Vzájemná interakce obou proteinů je závislá na poly(ADP-ribosyl)laci (zkráceně PARylaci) ubiquitin ligázy RNF168, kterou zajišťuje enzym PARP1. Zajímavé je, enzymatická aktivita proteinu PARP1 umožňuje v místech poškozené DNA vazbu i remodelačnímu komplexu z podrodiny CHD - NuRD (71). PARylace chromatinu se proto zdá být jeden z důležitých mechanismů, kterým jsou chromatin remodelační komplexy přinášeny

do míst dvouvláknových zlomů na DNA. Dále se ukazuje, že SMARCA5 může být do míst poškozené DNA přinášén i zmíněnou deacetylázou SIRT6, jež se objevuje v místech dvojřetězcových zlomů jako jeden z prvních faktorů (61). V souhrnu, počátek oprav dvouvláknových zlomů DNA vyžaduje navázání chromatin remodelujících aktivit včetně proteinu SMARCA5 a rozsáhlé posttranslační modifikace histonů a proteinů oprav v místě poškození DNA.

Jak už bylo řečeno v úvodu, opravy dvouvláknového poškození DNA zajišťují u savců dvě dráhy – HR a NHEJ. Homologní rekombinace je přesná oprava zlomů na DNA, která obvykle negeneruje mutace v místě poškození DNA. Ukazuje se, že v místech oprav mechanismem HR se protein SMARCA5 objevuje poté, co se do těchto míst naváže E3 ubiquitin ligáza RNF20 (60, 66). Autoři popsanych prací naznačují, že mono-ubiquitylace histonu H2B na reziduu 120 (lyzin), kterou u savců v průběhu DDR zajišťuje právě ligáza RNF20 (v heterodimeru s ligázou RNF40), může fungovat jako další mechanismus pro přinášení remodelačních aktivit SMARCA5 do chromatinu poškozené DNA (60, 66, 72). HR vyžaduje úpravu konců DNA na obou stranách zlomu, kdy se za pomoci 5'-3' exonukleázové aktivity vytvoří dlouhé jednovláknové meziprodukty, které následně slouží pro hledání homologní sekvence na sesterské chromatidě. Homologní sekvence sesterské chromatidy slouží jako vzor, podle kterého se poškození DNA opraví. Procesu vytvoření jednovláknových meziproduktů DNA se účastní mnoho molekul a bylo ukázáno, že deplece proteinu SMARCA5 vazbu některých těchto molekul (např. RPA, RAD51 a BRCA1) na volné konce přerušené DNA inhibuje (60).

NHEJ je způsob oprav dvouvláknových zlomů, který nevyžaduje ani homologní sekvenci ani rozsáhlé úpravy konců DNA jako HR. Tím, že se nukleotidová sekvence neopravuje podle vzoru, může docházet k mutacím obvykle inzercím nebo delecím, které v případě, že vyskytnou v kódující genové oblasti, mohou způsobit ztrátu produkce příslušného proteinu. NHEJ oprava začíná nejprve tím, že dojde k rozeznání a vazbě heterodimeru Ku70/80 na každý z obou volných konců DNA. Některé studie ukazují, že remodelační komplex ACF fyzicky interaguje s proteinem Ku70 (skrže jeho podjednotku ACF1) a pomáhá akumulovat heterodimer Ku70/80 (NHEJ) v oblasti dvouvláknových zlomů DNA (59). Proteinový komplex Ku70/80 následně umožní přiblížení volných konců DNA k sobě a indukuje vytvoření vazebného místa pro katalytickou podjednotku na DNA závislé protein kinázy (DNA-PK). Po vazbě DNA-PK do tohoto místa dochází k aktivaci její kinázové aktivity, která stimulačně fosforyluje nukleázu Artemis. Nukleáza Artemis poté svojí 5'-3' exonukleázovou aktivitou začne odstraňovat krátké jednořetězcové úseky z obou konců DNA a umožní jejich „zatupení“. Tím se otevře cesta pro

vazbu proteinu XRCC4 a DNA ligázy IV (LigIV), která na konci celého procesu katalyzuje kovalentní propojení obou přerušných konců DNA (shrnutí (58)).

Studie autorů Xiao a spol. ukazuje, že i další vazebný partner ATPázy Smarca5, protein Wstf, má význam v opravách poškozené genetické informace (73). Autoři této práce připisují proteinu Wstf (vazebný partner proteinu Smarca5 v komplexu WICH) vnitřní kinázovou aktivitu, díky které může tento protein fosforylovat histon H2AX na reziduu Tyr142. Zmíněná histonová modifikace je oproti fosforylaci stejné varianty histonu H2 na Ser139 ( $\gamma$ H2AX) přítomna v chromatinu ještě před tím, než k poškození DNA dojde a s indukcí poškození se modifikace z chromatinu vytrácí (73). Zdá se, že je údržba této chromatinové „značky“ proteinem Wstf důležitá z hlediska provedení časné chromatinové remodelace těsně po vzniku poškození DNA. Deplece proteinu Wstf v myších embryonálních fibroblastech (MEF) dále způsobuje (mechanismus není popsán), že se z míst dvojřetězcových zlomů předčasně vytrácí modifikace  $\gamma$ H2AX, která je nutná k efektivnímu dokončení DNA oprav. Autoři práce shrnují, že protein Wstf nemá vliv na vznik  $\gamma$ H2AX (tak, jako v případě fosforylace histonu H2AX na Tyr142), ale pokud se již tato histonová modifikace v chromatinu objeví, Wstf slouží jako její „údržbář“.

Komplex RSF se skládá ze dvou podjednotek – katalytické Smarca5 a nekatalytické RSF1 (74). Protein RSF1 se podobně jako protein Smarca5 akumuluje v místech dvojřetězcových zlomů na DNA a uplatňuje se jak v opravách mechanismem homologní rekombinace tak i NHEJ (75, 76). Tento protein může být zřejmě fosforylován kinázou ATM na některém z jeho pSQ motivů a fosforylace je zároveň nutná k vazbě RSF1 do míst poškození DNA (63). Na RSF je zajímavé, že na rozdíl od ostatních ISWI komplexů, které jsou schopné „pouze“ remodelovat chromatin *in vitro*, tento komplex navíc umí chromatinovou strukturu vytvářet. Protein RSF1 nese tzv. histon chaperonovou aktivitu (váže H3-H4 tetramer), kterou je možné využít pro náhodné umísťování histonů na vlákno DNA. Smarca5 pak těmito náhodně umístěnými nukleozomy pohybuje, takovým způsobem, že mezi nimi ve výsledku zůstanou pravidelné rozestupy (77). Protein RSF1 může použít svojí histon chaperonovou aktivitu také pro výměnu různých histonových variant v nukleozómech (34). Některé práce ukazují, že se v chromatinu dvouvláknového poškození DNA objevují i centromerické proteiny CENP-S a CENP-X (75, 76). Tyto proteiny, které byly v minulosti popsány jako součást kinetochor či komplexu proteinů Fanconiho anémie při opravách kovalentních propojení mezi dvěma vlákny DNA, vytváří heterotetramerní komplex připomínající svou strukturou H3-H4 tetramer (78). Autoři zmíněných prací spekulují, že protein Rsf1 může díky své histon chaperonové aktivitě

zajišťovat výměnu „běžných“ variant histonů H3-H4 za CENP-S a CENP-X tetramery v blízkosti poškození DNA a tato výměna následně usnadní vazbu faktoru NHEJ oprav, proteinu XRCC4 (75). Nezdá se však, že by popsaná reakce byla závislá na proteinu SMARCA5 (75).

V pracích zmíněných v předchozím odstavci, bylo ukázáno, že deplece proteinu RSF1 zvyšuje citlivost buněk ke genotoxickému stresu (76). Ukazuje se, že i nefyziologický nárůst intracelulární hladiny proteinu Rsf1, který se objevuje u některých nádorových onemocnění (79), má vliv na genomovou stabilitu. Experimenty s lentivirovým přenosem transgenního konstruktu nesoucího cDNA genu *Rsf1*, ukázaly, že neregulované zvýšení Rsf1 způsobuje v buněčných liniích akumulaci zlomů v molekule DNA (80). Vznik těchto poškození byl závislý na vzájemné interakci proteinu Rsf1 se Smarca5 (komplexu RSF) a doprovázela ho aktivace DDR – byla detekována fosforylace histonu H2AX ( $\gamma$ H2AX), aktivace dráhy p53, zástava růstu a aktivace apoptotických drah (80). Popsaná pozorování naznačují, že intracelulární hladiny proteinu Rsf1 a ostatních interakčních partnerů ISWI ATPáz musí být v dokonalé rovnováze, protože jen tak mohou zajišťovat správnou údržbu chromatinové struktury a chránit genetickou informaci před jejím poškozením a v případě poškození umožnit její efektivní opravu.

### 6.8 Vliv ISWI komplexů na globální strukturu chromozomu

Naprostá většina genetické informace eukaryotních buněk je uložena v buněčném jádře a rozdělena do jednotlivých chromosomů. U chromosomů můžeme pozorovat mimo oblastí, jež kódují genetickou informaci také oblasti, které plní především strukturní funkci jako jsou např. telomery a centromery chromosomů. Současné studie ukazují, že se „údržby“ chromatinové struktury těchto strukturních oblastí účastní protein Smarca5 a s ním spojené remodelační komplexy – RSF, NoRC.

Klíčovou částí každého chromosomu, která mu umožňuje segregovat do dceřiných buněk v průběhu mitotického dělení, je struktura centromery. Pro centromery jsou typické oblasti opakujících se (repetitivních) sekvencí tzv. satelitní DNA, na které jsou navázány nukleozomy se specifickou variantou histonu H3 – centromerickým proteinem A (CENP-A). Ukazuje se, že na stabilitu centromer a přítomnost proteinu CENP-A v jejich chromatinové struktuře má významný vliv i remodelační komplex RSF. Deplece komplexu RSF vyvolá v experimentální buněčné linii (buňky HeLa) pokles CENP-A proteinu asociovaného s nukleozomy a narušení normálního průběhu mitózy (81). Podobně jako v případě oprav dvouvláknových zlomů na DNA se i u nukleozomů centromerických oblastí předpokládá, že v nich protein RSF1 uplatňuje svojí histon chaperonovou aktivitu, pro výměnu běžných variant histonů H3 za CENP-A (81).

Pro viabilitu buněk a stabilitu jejich genomu je dále velice důležité udržet centromerické či jiné repetitivní oblasti chromozomů, které v případě myšního genomu tvoří až 44% veškeré genetické informace (82), ve struktuře heterochromatinu. Repetitivní oblasti mohou podléhat homologní rekombinaci a umístění repetitivních do struktury heterochromatinu je pravděpodobně jeden z mechanismů, které zajišťují omezení přístupu rekombinačního aparátu k těmto sekvencím. V případě remodelačního komplexu NoRC bylo ukázáno, že se i tento komplex účastní údržby chromatinu centromerických oblastí, tím že v nich pomáhá vytvářet represivní heterochromatinovou strukturu (35, 36). Pro chromatin centromerických oblastí je charakteristická přítomnost heterochromatinových posttranslačních modifikací histonů – H3K9Me3 a H4K20Me3 (82). V experimentální buněčné linii NIH3T3 s deplecí proteinu Tip5 (komplex NoRC) bylo ukázáno, že se tyto histonové modifikace z heterochromatinu satelitní DNA vytrácejí a naopak zvýšení exprese Tip5 v buňkách vedlo k jejich nabohacení (35). Rozvolnění chromatinu vyvolané absencí komplexu NoRC mělo za následek i zvýšení aktivity homologní rekombinace, protože analýza oblastí satelitní DNA odhalila ztrátu genetického materiálu (35). Úbytek genetického materiálu byla specificky pozorována také v případě dalších opakujících se genomických sekvencí DNA včetně telomer a ribosomálních genů (35, 36). S absencí komplexu NoRC se prodlužovala doba buněčného dělení, objevovalo se narušení struktury mitotického vřeténka, v průběhu anafáze byl detekován vznik chromozomálních mostů a docházelo k opoždění distribuce jednotlivých chromozomů do dceřiných buněk (angl. lagging chromosomes) (35, 36). V současnosti se ovšem spekuluje, na kolik jsou data z těchto *in vitro* experimentů relevantní, protože myši s homozygotní delecí genu Tip5 mají velice mírný fenotyp. Rozmnožují se, rodí se i dožívají se podobného věku jako kontrolní jedinci (83), což je v kontrastu s popsaným narušením genomové stability.

Biochemické studie využívající polynukleozomální substrát pro studium chromatinové remodelace ukazují, že komplex ACF má schopnost interagovat s nukleozomy, které obsahují histon macroH2A a katalyzovat pohyb nukleozomů s tímto histonem podél vlákna DNA (84). Histon macroH2A, který obsahuje přibližně dvakrát tak větší doménu na svém C-konci, než je on sám (proto „macro“ v názvu) (85), se vyskytuje v oblastech konstitutivního heterochromatinu a účastní se epigenetického umlčování genové transkripce. Jedním z nejznámějších případů, kde se histon macroH2A uplatňuje je, že je v průběhu embryonálního vývoje samic savců a každé replikace samičích buněk přinášén na jeden z chromozomů X. Data z popsaných biochemických studií tedy naznačují, že by se komplex ACF mohl na umlčování popř. údržby heterochromatinové struktury na umlčeném chromozomu X podílet.

Protein SMARCA5 se dále objevuje v přímé interakci s proteinem RAD21, což je podjednotka kohezinového komplexu (86). Tento komplex je tvořen v základu ze čtyř podjednotek (SMC1, SMC3, SA1/SA2, RAD21) a jeho funkcí je především v průběhu mitotického či meiotického dělení udržet sesterské chromatidy pospolu do doby než dojde k separaci chromozomů. Vazba kohezinu do chromatinu se ukazuje být závislá na SMARCA5, postranlačních modifikacích histonů (především na H3K4Me3) a nízkém methylačním statusu DNA v místě vazby. V současné době bylo potvrzeno, že k interakci mezi kohezinem a SMARCA5 může docházet v místech, které jsou rozeznávány transkripčním faktorem CTCF (87, 88). Data naznačují, že v těchto místech pomáhá kohezin faktoru CTCF tzv. „izolovat“ promotory od svých enhancerů a inhibovat transkripci některých genů, což se ukazuje jako další nekanonická funkce kohezinu (88).

Text předchozích odstavců byl založen především na vědeckých publikacích, které pro studium mechanismu remodelace chromatinové struktury využívaly bezbuněčné systémy popř. tkáňové linie rostoucí v podmínkách *in vitro*. Tyto práce sice pomáhají nastínit mechanismus fungování ISWI komplexů v různých biologických dějích ovšem v mnoha případech nelze vyloučit, že ke vzniku pozorovaných a v některých případech i protichůdných rolí chromatin remodelačních faktorů může přispívat i výběr samotné metody. Například bylo ukázáno, že míra deplece proteinu SMARCA5 za pomoci siRNA, která může být leckdy velmi variabilní, rozhoduje o výsledné citlivosti buněčných liniích k induktorům poškozujícím DNA a o intenzitě buněčné odpovědi na vzniklé poškození (65). Další limitací studia na tkáňových kulturách je, že neposkytují informaci ohledem významu remodelačních komplexů pro vývoj tkání a organismu jako celku. Lze si představit, že proliferující progenitory budou mít vyšší citlivost na ztrátu remodelačních komplexů oproti terminálně diferencovaným buňkám, které se přestaly dělit a nevyžadují replikovat jejich genetickou a epigenetickou informaci. Dále i tkáňově specifická míra exprese podjednotek remodelačních komplexů, bude spolurozhodovat o citlivosti dané tkáně či tkáňové kultury na depleci konkrétní podjednotky. Příkladem může být krvetvorba u lidí (i myší), kde je ve vysoké míře exprimován protein SMARCA5, zatím co SMARCA1 se zde prakticky nevyskytuje (89). Nelze tedy předpokládat, že by delece genu SMARCA1 výrazným způsobem ovlivnila krvetvorbu (90). Z popsanych důvodů se pro studium tkáňově specifické a vývojové funkce podjednotek chromatin remodelačních komplexů využívají zvířecí modely s genetickou úpravou, která umožňuje kontrolovaným způsobem regulovat intracelulární hladinu zkoumané podjednotky. Zvířecí modely pak pomáhají nejenže verifikovat výsledky biochemických studií, ale současně, pokud se použije



savčí (myši) experimentální model, umožňují podrobně studovat patogenezi lidských genetických onemocnění, které jsou spojeny s delecí genů pro podjednotky chromatin remodelačních komplexů.

### 6.9 Role remodelačních faktorů podrodiny ISWI a jejich interakčních partnerů v průběhu tkáňového vývoje savců

Tkáňová exprese remodelačního enzymu *Smarca5* se oproti ATPáze *Smarca1* výrazně liší. Gen *Smarca5* je exprimován prakticky ve všech tkáních dospělé myši, zatímco transkript genu *Smarca1* se objevuje pouze v omezené míře např. v mozku, děloze, vaječnících, testes a nejvíce v placentě (12, 91). Odlišná exprese obou ISWI ATPáz naznačuje, že se tyto proteiny mohou odlišovat i ve svých tkáňových a vývojových funkcích. Vzhledem k tomu, že je transkripce genu *Smarca5* nejvyšší v tkáních s vysokou proliferační aktivitou a v průběhu diferenciaci do postmitotických terminálně maturovaných stádiích klesá, předpokládalo se, že protein *Smarca5* bude důležitý především pro buněčný růst (12). Tento předpoklad byl následně podpořen mnoha dalšími pozorováními naší i ostatních laboratoří. Inaktivace genu *Smarca5* na začátku embryonálního vývoje vede k zástavě růstu buněk vnitřní buněčné masy i trofoektodermu a je pro myš letální už ve stádiu blastocysty (92-94). Cílená inaktivace genu *Smarca5* v progenitorech granulárních neuronů a Purkyňových buněk vede k inhibici jejich proliferace a výsledně hypoplázii mozečku (95). Podobně delece genu *Smarca5* v progenitorech oční čočky vede k narušení vývoje struktury oka (96). Při podrobnějším pohledu na narušený vývoj tkání v důsledku deplece *Smarca5* bylo zjištěno, že význam tohoto remodelačního faktoru nebyl pouze v usnadnění replikace genetické a epigenetické informace proliferujících progenitorů, ale především v ustanovení expresního programu konkrétních vývojových stádií (95, 96). A tak například u vláknitých buněk oční čočky můžeme po depleci *Smarca5* stále pozorovat buněčná jádra, protože se neaktivuje dostatečná exprese genů *Hsf4* a *DNasy IIβ*, které se účastní denukleace (96). Protein *Smarca5* je ve vysoké míře exprimován v testes (12), kde se účastní spermatogeneze. Je přítomen ve spermatocytech v profázi I až po stádium spermatocytů ve stádiu (18, 93). V experimentech, při kterých autoři indukovali náhodné mutace (mutagenem N-ethyl-N-nitrosourea) v germinálních buňkách myši byla objevena hypomorfni alela genu *Smarca5*, která vykazovala narušení paternálního přenosu epigenetické informace na potomky (93). U potomků heterozygotních samců na zmíněnou alelu *Smarca5* (W520R) se projevovala nižší exprese transgenní epistatické allelely zděděné po matce (93). Protein *Smarca5* se tedy zdá být vývojově důležitým epigenetickým regulátorem genové

exprese a v současnosti se ukazuje, že mechanismus této regulace je založen na chromatinové remodelaci, která umožňuje selektivní vazbu různým a vývojově důležitým transkripčním faktorům (97).

Jak už bylo nastíněno v předchozím odstavci, proteiny *Smarca5* a *Smarca1* jsou exprimovány společně v mozku, a mozek je orgán, kde byly podrobněji popsány i vývojové role obou ISWI ATPáz. V mozku myši je zastoupení transkriptu *Smarca5* nejvyšší embryonálně v průběhu časně neurogeneze a postnatálně, kdy proliferace neurálních progenitorů ustává, množství transkriptu *Smarca5* klesá. V případě transkriptu *Smarca1* byla pozorována opačná dynamika – tedy prenatální nízké hladiny a jeho postnatální nárůst především v terminálně diferencovaných postmitotických neuronech (12). Zatímco delece genu *Smarca5* způsobuje ztrátu cyklujících, mitotických a replikujících neurálních progenitorů, v případě inaktivace proteinu *Smarca1* se naopak objevuje buněčná expanze a hypercelularita předního mozku (90). Bylo ukázáno, že odstraněním katalytické aktivity ATPázové domény se znemožní proteinu *Smarca1* vykonávat jeho chromatin remodelační aktivitu, zejména pak vazbu do promotoru genu *Foxg1* a jeho epigenetického umlčení (90). Ve výsledku tato změna způsobí, že se myším s inaktivní formou *Smarca1* prodlužuje doba exprese genu *Foxg1* v intermediálních neurálních progenitorech, čímž se oddálí nástup jejich diferenciace, zvýší se počet buněčných dělení, které vede až k nefyziologickému nárůstu mozkové hmoty. Dalším orgánem, ve kterém jsou oba savčí ISWI proteiny společně exprimovány, jsou vaječníky (98). I zde se ukazuje, že zvýšenou expresí *Smarca5* můžeme pozorovat především ve vysoce proliferujících buňkách, konkrétně granulózních buňkách vyvíjejícího se primárního folikulu. Exprese genu *Smarca1* se v granulózních buňkách objevuje také, ale na rozdíl od *Smarca5* se zvyšuje až v průběhu ovulace, tedy v době kdy granulózní buňky diferencují a začne se tvořit *corpus luteum*. Proces vzniku *corpus luteum* (česky žlutého tělíska) z ovariálního folikulu se nazývá luteinizace a je doprovázen expresí genu *StAR* (angl. steroidogenic acute regulatory protein) diferencujícími granulózními buňkami. In vitro experimenty ukazují, že se *Smarca1* po stimulaci diferenciace granulózních buněk ganádotropním hormonem objevuje v proximálním promotoru genu *StAR*, kde je přímo vyžadován pro jeho aktivaci transkripce (98). *Smarca1* tedy hraje roli v indukci diferenciace proliferujících neurálních progenitorů a granulózních buněk ovárií.

Při analýze fenotypu experimentálních zvířecích modelů s delecí genů *Smarca5* a *Smarca1* je ovšem důležité si uvědomit, že ISWI ATPázy mohou být pravděpodobně redundantní ve svých buněčných funkcích. Fenotyp se nemusí při delecí jedné ISWI ATPázy v konkrétní tkáni zásadně projevit. Například v případě delece genu *Smarca1* pozorujeme

fenotyp pouze v mozku, přičemž je tento gen postnatálně exprimován i v jiných tkáních např. v testes, ováriích, placentě a děloze (12). Dále je vhodné zmínit, že klasické „knock-outy“ genů ISWI ATPáz mají v myších tkáních tak závažné fenotypy (embryonální letalitu v případě genu *Smarca5*, hypercelularitu předního mozku v případě *Smarca1*) nejen proto, že v buňkách těchto tkání dochází ke zrušení individuálních aktivit konkrétní ISWI ATPázy, ale také současně proto, že se přeruší chromatinová remodelace, kterou zajišťují všechny remodelační komplexy, ve kterých se ISWI ATPázy objevují. Využívaným způsobem, jak studovat tkáňově specifické funkce jednotlivých chromatin remodelačních komplexů je, podobně jako v případě biochemických studií, deletovat nebo modifikovat geny pro partnerské molekuly obou ISWI ATPáz. V následujících odstavcích budou popsány myší experimentální modely s delecí či hypomorfni změnou v genech pro partnerské molekuly proteinů *Smarca5* a *Smarca1*. Vzhledem k tomu, že mutace popř. delece (alespoň heterozygotní) v některých těchto genech souvisí i s vývojovými poruchami u lidí, budou tyto geny popsány jako první v pořadí.

Z klinické praxe je znám případ onemocnění Williamsova syndromu, jež je multisystémové autosomálně-dominantní onemocnění vyvolané heterozygotní delecí části chromosomu 7. V této části chromosomu se nachází mimo několika dalších genů i gen *BAZ1B*, který kóduje jednoho z vazebných partnerů proteinu *Smarca5*, protein WSTF, s nímž vytváří chromatin remodelační komplexy WICH a B-WICH (99). Protein WSTF se dále objevuje ve 13-ti podjednotkovém komplexu WINAC, v němž interaguje s remodelačními ATPázami BRG1 a BRM z podrodiny SWI/SNF (100). Fenotypové projevy Williamsova syndromu závisí především na rozsahu delece chromosomu 7, která je velmi variabilní a může díky ní dojít k odstranění 17 až 28 genů. Zajímavé je, že u pacientů, u kterých nedošlo k deleci genu *BAZ1B*, nedochází k vážným obličejovým změnám, které jsou pro toto onemocnění typické (101). Gen *Baz1b* je u dospělých savců exprimován prakticky každou tkání (21, 102). Zajímavé je, že u homozygotních myší, které nesly bodovou mutaci způsobující záměnu aminokyseliny L733R ve velice evolučně konzervované oblasti proteinu Wstf, se objevovaly mimo jiných vývojových změn i kraniofaciální deformace podobně jako u pacientů s Williamsovým syndromem (103). Změny vyvolané touto mutací měly většinou za následek neonatální letalitu a homozygotní jedinci umírali jen několik dní po porodu. Myší model nulové alely *Baz1b* tato pozorování potvrdil (104). Protein Wstf je tedy důležitý pro kraniofaciální vývoj a perinatální životaschopnost savců.

Při hledání genů zodpovědných za vznik syndromu kočičího oka byl mezi tzv. „CECR“ geny (angl. *C*at *e*ye syndrome *c*ritical *r*egion genes) nalezen i gen pro protein CECR2, který vytváří chromatin remodelační komplex CERF společně s ATPázou *Smarca1* (105). Syndrom

kočičího oka je vzácné vrozené onemocnění, které je způsobené amplifikací oblasti chromozomu 22 (objevují se tři až čtyři kopie oblasti 22q11,2 na buňku) (106). U pacientů s tímto onemocněním můžeme pozorovat velmi variabilní fenotypové projevy mimo vývojových vad očí také defekty v oblasti obličeje, srdce, ledvin a zřejmě i mozku, protože pacienti mají obvykle vrozenou mentální retardaci. Ačkoliv je gen pro *CECR2* u pacientů se syndromem kočičího oka přítomen v amplifikované oblasti chromozomu 22, souvislost zvýšené exprese proteinu *CECR2* s patogenezí tohoto onemocnění nebyla přímo prokázána. U savců je gen *Cecr2* exprimován v průběhu embryonálního vývoje především v nervovém systému v průběhu neurulace (105, 107). Homozygotní myši s hypomorfni popřípadě nulovou alelou genu *Cecr2* vykazují defekty vývoje vnitřního ucha a exencefalii, která je výsledkem selhání procesu uzavření neurální trubice (105, 107, 108). Defekty uzavření neurální trubice pak většinou stojí za perinatální letalitou homozygotů (105). Je potřeba říci, že penetrance mutace v genu *Cecr2* je proměnlivá a velmi závisí na použitém myším kmeni, takže někteří homozygotní jedinci přežijí do dospělosti bez výrazných známek vývojových změn. Jednou z důležitých změn fenotypu u přeživších dospělých zvířat je snížená plodnost homozygotních samců. V dospělosti je protein *Cecr2* přítomný především v testes (ve vyšší míře ve spermatogoniích, tedy kmenových buňkách spermií, a v nižší míře ve spermatocytech), kde se společně s ATPázou *Smarca5* tvoří chromatin remodelační komplex (18). Bylo ukázáno, že inaktivace genu *Cecr2* zásadně ovlivňuje schopnost spermií oplodnit ovum, navzdory zachované normální morfologii, motilitě či počtu zralých spermií v cauda epididymis (18). Protein *Cecr2* se tak účastní neurulace v embryonálním vývoji a vývoje mužských germinálních buněk v dospělosti.

Dalším příkladem vazebného partnera ISWI ATPáz, který se účastní spermatogeneze je protein *Acf1*. Gen *Baz1a*, jak už předešlá věta naznačuje, má nejvyšší expresi v testes, zatímco jeho proteinový produkt *Acf1* se v ostatních tkáních (včetně ovárií) zjišťuje jen velice obtížně (21, 102). Protein *Acf1* je nejsilněji detekovatelný ve spermatocytech stádia pozdního pachytene (stádia VIII, IX, X) tedy vývojově později v porovnání s proteinem *Cecr2* (102). V současnosti existují dva myší kmeny s inaktivovaným genem *Baz1a/Acf1*. Autoři studií, kteří s těmito kmeny pracovali, popisují, že homozygotní jedinci se rodí podle Mendelovského štěpného poměru a bez závažných vývojových a fenotypových změn, až na defekty vývoje mužských germinálních buněk (83, 102). Spermie homozygotních samců se produkují téměř v 5-ti násobně nižším množství, vykazují významné morfologické změny (hlavičky i ocásku), prakticky žádnou pohyblivost a bez umělého zásahu nejsou schopné oplodnit oocyt (102). K narušení spermatogeneze u *Acf1*<sup>-/-</sup> samců, zřejmě přispívá i narušení globální regulace genové

transkripce ve spermatidách (102). Zajímavé je, že navzdory rostoucím důkazům o účasti proteinu Acf1 a Smarca5 *in vitro* v procesu oprav dvouvláknových zlomů DNA (DSB) (59, 61, 109), myši s delecí *Acf1* nemají žádné výrazné defekty oprav DSB a to ani v buněčných liniích, ve kterých je vznik DSB vývojově programovaný – ve spermatocytech, oocytech, B-buňkách a T-buňkách (102). Další studie ukazují, že protein Acf1, i přes jeho nízkou přítomnost v mozku, může mít pravděpodobně vliv na vznik vrozeného mentálního postižení u lidí (110). Existuje případ pacienta, u kterého se právě vznik tohoto onemocnění připisuje mutaci v genu *BAZ1A* (F1348C) (110). Mutace v genu *BAZ1A* popřípadě deplece proteinu ACF1 vede ke změnám exprese genů regulovaných receptorem vitamínu D a genů důležitých pro vývoj nervového systému a jeho funkce (110). Vztah remodelačního proteinu Acf1 v regulaci mozkových funkcí byl prokázán i u myši (111). Fyziologické zvýšení intracelulárních hladin proteinu Acf1 bylo pozorováno po vystavení myši opakovanému stresovému vjemu v mozkové oblasti, která zpracovává např. pocity odměny, motivace a strachu - nucleus accumbens (NAc). Ukazuje se, že je Acf1 důležitý pro regulaci exprese genů v této mozkové oblasti a k vyvolání stresem indukovaného depresivního chování (111). Acf1 hraje významnou roli ve spermatogenezi a zřejmě i ve vývoji mentálních poruch u lidí a náchylnosti jedince k depresím a stresovému chování.

Protein Bptf je předposledním interakčním partnerem IWSI ATPáz, kterým se budu v této kapitole podrobněji zabývat. Experimenty využívající náhodnou inzerci bezpromotorového genu *LacZ* ukázaly, že gen pro tento protein se vysoce exprimuje v průběhu časného embryonálního vývoje a postnatálně jeho exprese klesá. Poprvé se exprese Bptf objevuje v buňkách vnitřní buněčné masy blastocysty (E4,5) a následně v buňkách epiblastu a extraembryonálním ektodermu (E5,5) (112, 113). V embryonální den E8,5 můžeme expresi pozorovat v chorionu, neurálním ektodermu, optických veziklích, somitech a rudimentu ocasu (112). U dospělých jedinců je exprese koncentrována především v testes, slezině, mozku a v menší míře v ledvinách (113).

V současnosti byly vytvořeny minimálně tři myší modely s germinální delecí genu *Bptf*. Dva z těchto modelů vznikly již zmíněnou náhodnou inaktivační inzercí sekvence pro gen *LacZ* (tzv. „knock-in“) a třetí vznikl rekombinací podmíněně deletovatelné alely *Bptf<sup>ΔExon2</sup>* (112, 113). U všech tří myších modelů byly popsány závažné vývojové změny těsně po implantaci do dělohy (E5,5) a opožděný růst oproti kontrolním embryím. Embryonální letalita se objevovala už 8,5 dne po oplození se 100% penetrancí, protože do embryonálního dne E11,5 se nedožil jediný homozygot s alelou *Bptf<sup>ΔExon2</sup>* (112, 113). Je zajímavé, že tento fenotyp velmi připomíná fenotyp knockoutu genu *Smarca5* u kterého se objevují vývojové změny také v den

E5,5 a embrya umírají těsně po implantaci nejpozději do 7,5 dne po oplození (92). Práce na embryonálních kmenových buňkách s genotypem *Bptf* <sup>$\Delta$ Exon2/ $\Delta$ Exon2</sup> ukázaly, že, i když není tento gen přímo esenciální pro buněčnou viabilitu, absence jeho proteinového produktu snižuje rychlost proliferace a schopnost diferenciovat směrem do mezodermy, endodermy a některých struktur odvozených z ektodermy (113). Protein Bptf se účastní diferenciací embryonálních buněk zřejmě skrze interakci s transkripčními faktory rodiny Smad, s jejichž pomocí reguluje expresi důležitých vývojových genů (113). Myší model podmíněně deletovatelné alely byl následně použit například pro studium role genu *Bptf* pro časný vývoj thymocytů (114), kmenových buněk krvetvorby (115), melanocytů (116) a mléčných žláz (117). Ve všech zmíněných případech se ukazuje, že absence Bptf nemá zásadní vliv na viabilitu, ale především na diferenciaci kmenových buněk a progenitorů, protože významně inhibuje produkci z nich odvozených maturovaných buněčných stádií (např. melanin produkujících melanocytů nebo CD4 a CD8 pozitivních T lymfocytů) (113, 116). Podobně jako v případě embryonálních kmenových buněk, tak i v kmenových buňkách a progenitorech adultních tkání pomáhá protein Bptf udržovat otevřenou chromatinovou strukturu enhancerů a promotorů genů, jež jsou nutné pro aktivaci expresních programů souvisejících s diferencí (114, 116, 117). Situace bude ale zřejmě ještě komplexnější. Současné studie zabývající se krvetvorbou přinášejí důkazy o tom, že protein Bptf reguluje také expresi genů, které naopak souvisí s údržbou kmenového stavu (angl. stem cell maintenance) a sebe-obnovou kmenových buněk (angl. self-renewal) (115). V souhrnu, protein Bptf je pro savce důležitý, jak z hlediska vývoje mnoha embryonálních struktur, tak i z hlediska vývoje a obnovy tkání dospělého.

Poslední interakční partner ISWI ATPáz, který má také svou mutovanou alelu v myši, je protein Tip5. Tuto alelu ovšem nevytvořila laboratoř zabývající se konkrétně remodelačními komplexy podrodiny ISWI, ale Mezinárodní konsorcium pro fenotypizaci myší (zkratka angl. názvu IMPC). Díky objevu velmi rychlé a dostatečně specifické techniky editace genomu CRISPR/Cas9, umožnilo tomuto konsorciu si vytyčit cíl vytvořit a následně fenotypizovat 5 000 unikátních myších „knockoutů“ podle standardizovaných postupů (83). Výsledky z popsaných analýz fenotypu myších „knockoutů“ je kontinuálně doplňováno a publikováno ve veřejně dostupné databázi na stránkách konsorcia (<http://www.mousephenotype.org/>). U myší s homozygotní mutací genu *Baz2a/Tip5*, jak bylo zmíněno v předešlé kapitole, je uvedeno, že tyto myši mají mírný fenotyp, rozmnožují se normálně a žijí podobně dlouho jako kontrolní zvířata. Největší fenotypové změny byly pozorovány v testech, krvetvorbě a ledvinách. Určitou nevýhodou dat uveřejněných na stránkách konsorcia je někdy jejich malá podrobnost a absence závěru pozorování. A tak zůstává nezodpovězeno, jak skutečně zásadní jsou popsané

fenotypové změny, a jak například významnou úlohu hraje gen *Tip5* v testes, když je plodnost u homozygotních samců zachována. Vysvětlení tohoto fenotypu zřejmě zůstane na jiných investigátorech, kteří si mohou myš do svého chovu objednat a touto problematikou se podrobněji zabývat.

### 6.10 Úvod do krvetvorby

Krvetvorba je charakterizována jako proces tvorby krevních elementů a jedná se o jednu z nejvíce regenerativních tkání organismu. Účelem této tkáně je po celý život jedince od embryonálního vývoje až po dospělost vytvářet a obnovovat relativně krátce žijící terminálně diferenciovaná stadia jednotlivých krevních řad. Na počátku krvetvorby se nachází krvetvorná kmenová buňka, která nese jednak schopnost vlastní sebe-obnovy, tzn. po celý život jedince zajišťuje dostatečný počet svých „kopií“, a za druhé může aktivováním diferenciačních programů dát vznik progenitorům elementů s naprosto odlišnou biologickou funkcí. Krvetvorná kmenová buňka (angl. Hematopoietic stem cell - HSC) je obecně charakterizována jako buňka s unikátní schopností obnovit hematopoézu i v příjemcích, kterým byla vlastní krvetvorba např. chemicky nebo ionizujícím zářením odstraněna.

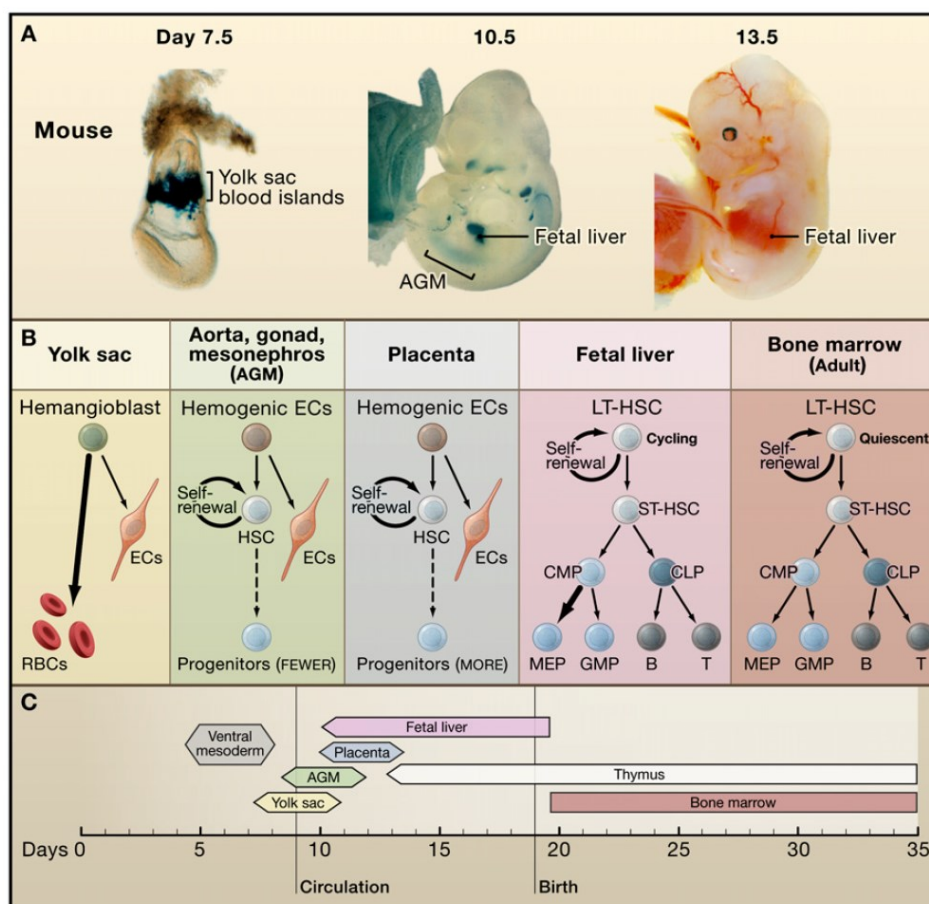
Hlavním místem krvetvorby většiny dospělých savců je kostní dřev. V průběhu embryonálního a fetálního vývoje se ovšem krvetvorba objevuje přechodně i v jiných strukturách například extraembryonálně ve žloutkovém vaku, v placentě, v allantois a pupečnickových artériích; intraembryonálně v oblasti sousedící s dorzální aortou zvanou aorta-gonad mesonephros (AGM), v játrech a slezině (viz. obrázek č.3A, C). Každá embryonální struktura popř. tkáň se mírně liší ve schopnosti produkovat elementy konkrétních krevních řad a zároveň proliferační schopností HSC. A tak zatímco ve fetálních játrech HSC aktivně proliferují, v kostní dřevě jsou tyto buňky především v klidovém nedělícím se stavu. Aktivní proliferace fetálních HSC zřejmě může vysvětlovat i obecné pozorování, kdy HSC buňky izolované z fetálních jater rychleji obnovují krvetvorbu v příjemci než HSC odvozené z kostní dřevě dospělého.

Velmi časný embryonální vývoj probíhá bez přítomnosti krevních elementů. Krvetvorba se objevuje až v době, kdy embryo doroste do rozměrů, které neumožní jeho tkáň zásobovat kyslíkem přinášeným pouhou difuzí. Prvním místem tvorby krevních elementů je mesoderm žloutkového vaku a krvetvorba z něj odvozená se nazývá „primitivní“. V tomto období, které můžeme u myši mapovat od 7-7,5 dne po oplození, je hlavní funkcí hematopoézy především tvořit primitivní jaderné erythrocyty exprimující embryonální globiny (*Hba-x*, *Hbb-y*, *Hbb-*

*bhl*), primitivní makrofágy a megakaryocyty (118). Tato krvetvorba je velmi krátkodobá a přibližně devátý den embryonálního vývoje se vytrácí. Elementy z ní odvozené se pak v dospělci neobjevují a jsou nahrazeny buňkami z druhé vlny tzv. „definitivní“ hematopoézy. Předpokládá se, že zdrojem elementů primitivní krvetvorby ve žloutkovém vaku je tzv. hemangioblast, tedy progenitor s potenciálem vytvořit buňky krve i cév současně. Hemangioblasty agregují do tzv. krevních ostrůvků (angl. blood islands na obrázku č.3A), kde buňky nacházející se vně každého z ostrůvku vydiferencují do angioblastů a z vnitřních buněk se stanou progenitory primitivních krevních elementů (119). Zajímavé je, že primitivní krvetvorba na rozdíl od té definitivní probíhá bez účasti kmenových buněk schopných dlouhodobé sebe obnovy.

Prvními místy vzniku buněk se vlastnostmi HSC, tedy schopností obnovit produkci krevních buněk v příjemcích s destruovanou hematopoézou, je oblast AGM (120) a placenta (121). Podobně jako v případě progenitorů primitivní krvetvorby, se kmenové buňky definitivní krvetvorby tvoří z endoteliálních buněk s hemogenním potenciálem procesem zvaným EHT (angl. endothelial-to-hematopoietic transition) (122). Hemogenní endotel se v případě AGM nachází ve ventrální stěně aorty a na rozdíl od hemangioblastů žloutkového vaku vyžaduje pro diferenciaci do krevních elementů expresi hlavního transkripčního faktoru krvetvorby *Runx1* (123). V AGM myši se podobně jako v placentě objevuje krvetvorba už od 9,5 dne embryonálního vývoje tedy těsně poté, co začne tlouct srdce a objeví se poprvé cirkulace embryonální krve (tj. E9). Předpokládá se, že HSC, které vznikají z AGM nebo placenty, následně skrze krevní řečiště kolonizují orgány, jež zřejmě nejsou schopny svou vlastní HSC *de novo* vytvořit - játra, thymus, slezinu a kostní dřeň. Kolonizace fetální jater kmenovými buňkami krve nastává přibližně v den E12,5 a od tohoto dne až do pozdního stádia embryonálního vývoje se játra stávají hlavním místem definitivní krvetvorby. V období kolem narození přebírá tuto funkci kostní dřeň a částečně i slezina.

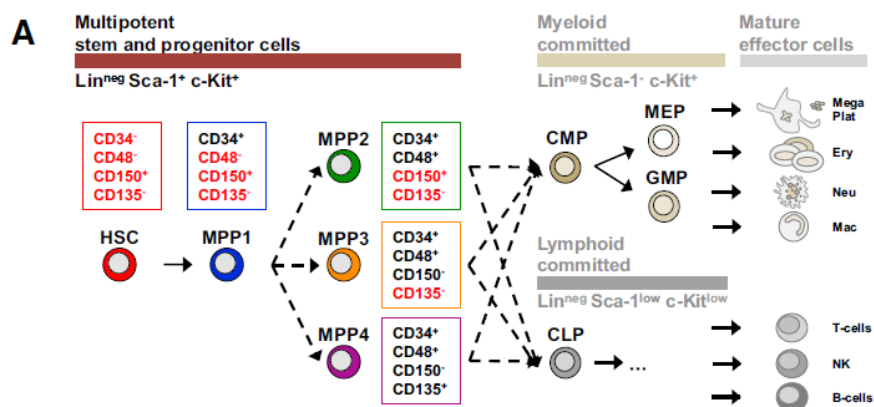




**Obrázek č.3:** Schematické znázornění vývoje krve tvorby v myši. Krvetvorba se poprvé objevuje v krevních ostrůvcích žloutkového vaku přibližně sedmý den po oplození. Jedná se tzv. primitivní krvetvorbu odvozenou z hemangioblastu. Později se krvetvorba objevuje v embryonální struktuře zvané aorta-gonad mesonephros (AGM). Z homogenního endotelu AGM poprvé vznikají krvetvorné kmenové buňky definitivní (HSC) hematopoézy. Tyto HSC brzy migrují krevním řečištěm a dostávají se následně do jater, hlavního orgánu krvetvorby v embryonálním vývoji. A) Fotografie myšního embrya ve věku 7,5; 10,5 a 13,5 dne po oplození s vyznačenými krvetvornými orgány. B) Schéma vývoje krevních elementů v daných embryonálních strukturách a orgánech. C) Časová osa ukazující začátek a konec tvorby krevních buněk z jednotlivých embr. struktur a orgánů. EC – endoteliální buňka; RBC – červená krvinka; HSC – krvetvorná kmenová buňka; CMP – společný myeloidní progenitor; CLP – společný lymfoidní progenitor; MEP – progenitor megakaryocytů a erythrocytů; GMP – progenitor granulocytů a makrofágů; B a T – lymfocyty. Obrázek převzat z publikace (124).

Definitivní krvetvorba na rozdíl od hematopoézy odvozené z hemangioblastu žloutkového vaku je schopna dát vznik všem krevním elementům. Mezi ně například patří červené krvinky, destičky produkující megakaryocyty, myelocyty (bazofily, neutrofil, eozinofily, monocyty, makrofágy) a lymfocyty (T, B, NK buňky). Jak již bylo několikrát zmíněno, všechny tyto krevní elementy vznikají ze společné hematopoetické kmenové buňky. Obvykle je kmenová buňka označována jako „long term – HSC (LT-HSC)“, protože je schopná zajišťovat v organismu kompletní krvetvorbu po dlouhou dobu (celý život) a vzhledem

k pomalému dělení také žije déle než ostatní z ní odvozené buňky. Z LT-HSC následně vznikají tzv. multipotentní progenitory (MPP) tedy populace buněk s krátkodobou („short-term“) kapacitou obnovovat krevetvorbu a bez možnosti vlastní sebe-obnovy. Pro studium a odlišení velmi časných buněčných populací potažmo většiny vývojových stádií krevetvorby se používá analýza exprese povrchových molekul (markerů) pomocí průtokové cytometrie. Bylo zjištěno, že LT-HSC a MPP jsou součástí tzv. populace LSK – tedy buněk negativních na markery terminální diferenciace ( $\text{Lineage}^-$ ) a pozitivních na antigen kmenových buněk ( $\text{Sca-1}^+$ ) a receptor růstového faktoru kmenových buněk ( $\text{c-Kit}/\text{CD117}$ ). Největší procento buněk s kmenovým potenciálem se pak nachází v subpopulaci, která je pozitivní na molekulu  $\text{CD150}^+$  ale negativní popř. slabě exprimující molekuly  $\text{CD48}^-\text{CD34}^{\text{low}}$  (viz. obrázek č.4) (125). Povrchová exprese molekul  $\text{CD150}$ ,  $\text{CD48}$ ,  $\text{CD34}$  a  $\text{CD135}$  následně umožňuje rozlišovat subpopulace LSK buněk s různým potenciálem tvořit myeloidní či lymfoidní progenitory (126). Tím jak multipotentní progenitory diferencují, ztrácí expresi markerů kmenových buněk ( $\text{CD150}$  a  $\text{Sca-1}$ ) a zároveň se omezuje jejich schopnost vytvářet buňky ostatních krevních řad. Velmi časně se tak od sebe oddělují společný myeloidní progenitor (CMP) – dává vznik myeloidním buňkám, od společného lymfoidního progenitoru (CLP) – dává vznik lymfoidním buňkám. CMP následně diferencuje buď do společného progenitoru megakaryocytů a erythrocytů (MEP) nebo progenitoru granulocytů a makrofágů (GMP) (viz. obrázek č.4).



**Obrázek č.4:** Schematické znázornění časného vývoje definitivní krevetvorby dospělé myši podle exprese povrchových molekul. Krevetvorná kmenová buňka (HSC) dává vznik multipotentním progenitorům (MPP) a ty následně dávají vznik progenitorů, které jsou společné pro myeloidní (CMP) nebo lymfoidní (CLP) krevní řadu. Obrázek převzat z publikace (126)

### 6.11 Thymocytní vývoj u myši

Časný vývoj T-lymfocytů se uskutečňuje v thymu. Tento specializovaný orgán imunitního systému, který se vyvinul především pro vyzrání  $\alpha\beta$  a  $\gamma\delta$  T-lymfocytů a některých podtypů NK buněk, můžeme nalézt v mediastinu za hrudní kostí v těsné blízkosti srdce. Protože v thymu se nenachází krvetvorná kmenová buňka, musí být tento orgán kontinuálně zásoben multipotentními progenitory (např. CLP), které pochází z fetálních jater nebo v dospělosti z kostní dřeně. K repopulaci thymu dochází u myši poprvé kolem embryonálního dne 12,5 a první maturované T-lymfocyty se objevují v neonatálním období. Multipotentní progenitory posléze, co se objeví v thymu, diferencují a prochází sérií velmi dobře charakterizovaných vývojových událostí (127). Tyto události směřují především k maturaci antigenního receptoru a jsou doprovázeny mimo jiné změnami exprese důležitých transkripčních faktorů a některých povrchových molekul (viz. obrázek č.5). Na začátku thymocytního vývoje se z multipotentních progenitorů vyvíjí nezralá tzv. dvojité negativní (DN) stádia thymocytů (chybí exprese CD4 a CD8) rozlišována podle povrchových molekul CD44, CD25 a c-Kit do čtyř základních subpopulací: DN1 až DN4. Stádium DN1 označované jako časný thymický progenitor (ETP) a DN2a ještě nejsou plně předurčeny stát se T-lymfocytem. Pro maturaci do následujících stádií a získání T-buněčné identity je zapotřebí kontinuální stimulace jejich receptorem Notch1 prostřednictvím epiteliálních buněk thymu. Stimulované ligandem receptoru Notch1 a dalšími ligandy receptorů růstových faktorů (hlavně c-Kit, IL-7R a FLT3) DN2a buňky intenzivně proliferují až do stádia DN3a, kdy se zastaví v G1 fázi buněčného cyklu. V této fázi poté začnou thymocyty aktivně přeskupovat genový lokus pro  $\beta$  podjednotku TCR. Jakmile dojde k produktivnímu přeskupení genů, kdy je zachován čtecí rámec a exprimuje se proteinová molekula  $\beta$  podjednotky schopná párovat s invariantním pre-T $\alpha$  řetězcem a dalšími komponentami T buněčného komplexu (CD3), buněčná proliferace se opět aktivuje. Exprese funkčního pre-TCR komplexu současně končí období závislosti DN thymocytů na signalizaci receptorem Notch1 a začíná období závislosti na signalizaci receptorem TCR. DN3a buňky v této fázi prochází procesem tzv.  $\beta$ -selekcí, tzn., jestliže nezískají signály skrze funkční pre-TCR komplex, nemohou dále proliferovat a vstupují do apoptózy. DN3b stádium se vyznačuje expresí funkční  $\beta$  podjednotky TCR, proliferační aktivitou, ukončováním povrchové exprese CD25 a naopak zvýšením exprese kostimulačních molekul (např. CD28, CD27) a adhezivních molekul (např. CD2, CD5) (128). Signály z pre-TCR komplexu aktivují diferenciaci DN3b buněk do DN4 (CD25<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>) a následně do stádia dvojité pozitivní thymocytů (DP), které na svém povrchu exprimují obě kostimulační molekuly T buněčného receptoru - CD4 a CD8 (129). U dvojité pozitivní thymocytů následně pozorujeme snížení povrchové

exprese transferrinového receptoru (CD71), jež souvisí se zástavou buněčného cyklu v G1 a aktivací přeskupování genů pro řetězec TCR $\alpha$  (130, 131). Tyto CD71 negativní DP buňky (největší zastoupená populace thymocytů v thymu) začínají následně po úspěšném přeskupení genů pro TCR $\alpha$  exprimovat na svém povrchu kompletní TCR $\alpha\beta$  receptor a podléhají pozitivní a negativní selekci. Testuje se tak schopnost jejich TCR $\alpha\beta$  receptoru vázat svůj ligand - tzn. MHC glykoproteiny (pozitivní selekce) a schopnost rozlišit tělu vlastní tzv. „self“ antigen vázaný MHC glykoproteiny (negativní selekce). Úspěšně selektované buňky poté začínají podle afinity jejich TCR $\alpha\beta$  k MHC glykoproteinům I. nebo II. třídy ztrácet expresi CD4 respektive CD8 molekuly a stávají se tzv. „single“ pozitivní (SP) populací, která buď jako pomocná tzv. „helper“ CD4 pozitivní nebo jako cytotoxická CD8 pozitivní buněčná linie opouští thymus do periferie (132). V současnosti se ukazuje, že pro vývoj thymocytů v thymu je velice důležitá enzymatická aktivita některých faktorů remodelujících chromatin, které jsou evolučně příbuzné se studovaným proteinem Smarca5 viz dále (133, 134).

Diferenciace multipotentních progenitorů do terminálně diferenciovaných stádií je proces, na jehož počátku stojí rozhodnutí, jakou liniovou cestou se progenitor vydá. Toto rozhodnutí je ovlivněno především vnějšími faktory např. hematologickými cytokiny a různými ligandy, které progenitor liniově směřují. Další neméně důležitou součástí procesu diferenciace je aktivace vnitřních molekulárních mechanismů, které toto rozhodnutí „otisknout“ do chromatinu a nevratně tak předurčí osud nezralé buňky. Celý proces doprovází globální změny genové exprese, kdy se zapínají liniově specifické geny, ale současně se vypínají časné geny související s multipotencí nebo jinými krevními řadami. V buňkách pak vzniká složitá regulační síť, na jejímž počátku je aktivace exprese hlavních liniově determinujících transkripčních faktorů, které následně aktivují další transkripční faktory, epigenetické regulátory, kofaktory a další molekuly, jež nastaví kurz následnému vývoji nezralých buněk.

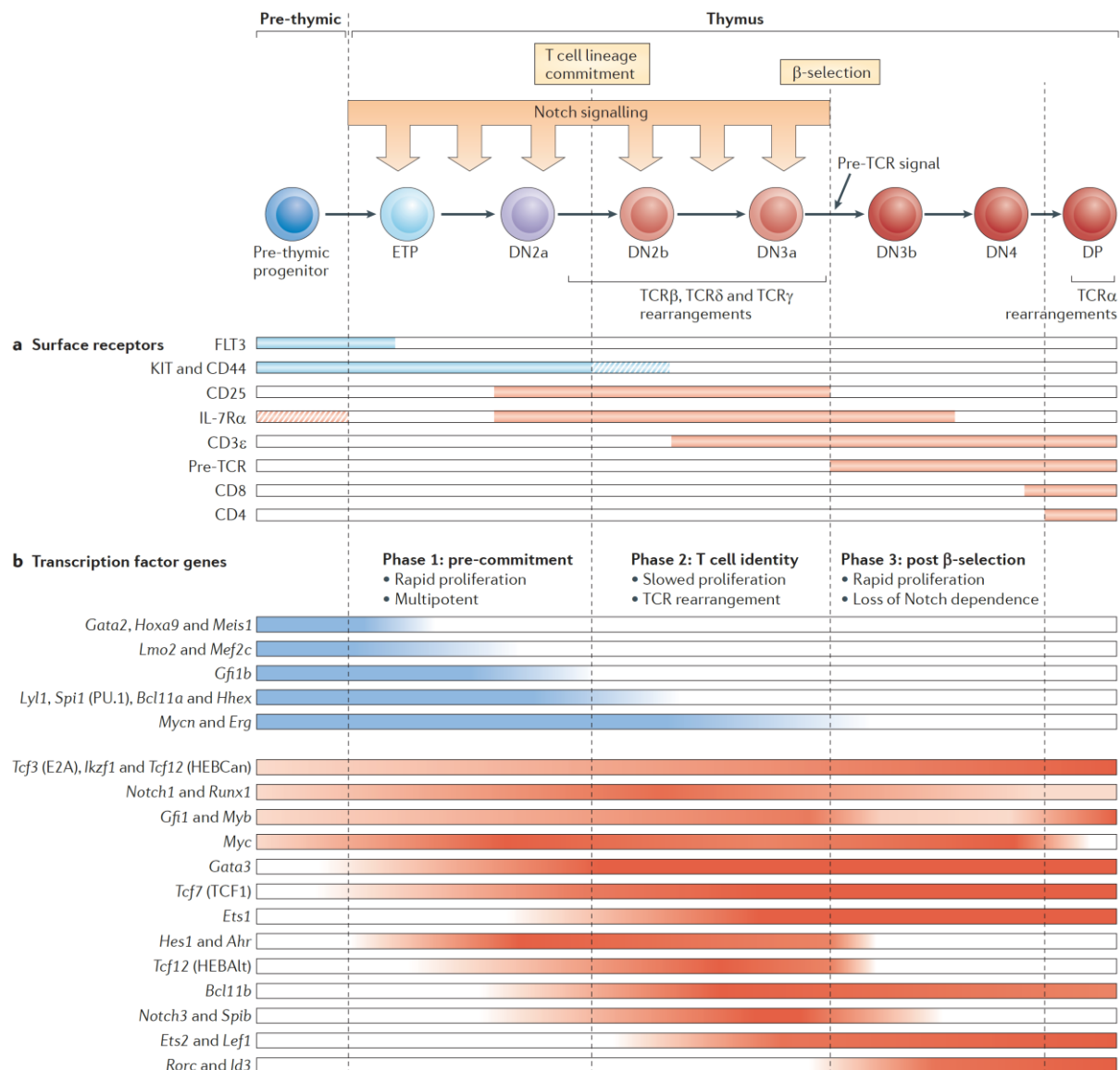
Časný vývoj T-lymfocytů začíná příchodem multipotentních progenitorů do thymu. Multipotentní progenitory doposud exprimují transkripční faktory, důležité především pro udržování dediferencovaného stavu krvetvorných kmenových buněk např. *Gata2*, *Gfi1* či *Lmo2*, nebo faktory, které poskytují nezralým progenitorům proliferační signály a signály inhibující apoptózu např. *Meis1*, *Hoxa9* a *Mycn*. V tomto období se také exprimuje transkripční faktor PU.1, jehož kanonickou funkcí je indukovat v multipotentních progenitorech diferenciální kaskádu směrem do myelocytů a jeho exprese je důležitá také pro vývoj B-lymfocytů. Ukazuje se, že transkripční faktor PU.1 může v časných progenitorech fungovat jako antagonist Notch1 signalizace. PU.1 je schopen inhibovat transkripci genů pro faktory thymocytárního vývoje, jejichž exprese je spouštěna Notch1 signalizací – *Myb*, *Tcf7* a *Gata3*

(135). Pokud ETP či DN2a nedostanou signál skrze receptor Notch1, nejenže nemohou buňky těchto stádií nastoupit T-lymfocytární vývoj, ale současně mohou být fyziologicky exprimovaným PU.1 instruovány pro diferenciaci do myelocytů (135). Přestože, produkce proteinu PU.1 je v thymocytárním vývoji eliminována velmi záhy a do vývoje T-liniově specifikovaných buněk (od DN3a) tento protein prakticky nemůže zasahovat, má zřejmě obrovský vliv na genezi a přežití multipotentních progenitorů, které osidlují thymus (136). Transkripční faktor PU.1 tak může, vzhledem k antagonistické funkci k Notch1 signalizaci, sloužit pro oddálení diferenciaci časných progenitorů (ETP) a pravděpodobně jim umožnit dosáhnout většího počtu dělení.

Poté, co signalizace přes receptor Notch1 přeruší inhibici exprese transkripčních faktorů *Gata3* a *Tcf7*, dochází k jejich produkci a (od stádia DN2a) k molekulárním změnám vedoucím k nevratné specifikaci do T-lymfocytární linie specifikace. Experimenty s *in vitro* diferenciací HSC odvozených z fetálních jater *Gata3*<sup>-/-</sup> embryí ukázaly, že transkripční faktor Gata-3 hraje roli v umlčování PU.1 a současně spoluvytváří ireverzibilní transkripční program, který zabraňuje velmi časným thymocytům vydat se cestou B-buněčného vývoje (137). Analýza myši s vyřazeným genem *Tcf7* ukazuje, že proteinový produkt tohoto genu, transkripční faktor Tcf-1, je důležitý pro zajištění základních metabolických procesů ETP/DN1 stádia, především pro proliferaci a inhibici apoptózy (138). Přestup do T-buněčně specifikovaného stádia v DN2b také doprovází zvýšená exprese faktoru *Bcl11b* (viz. obrázek č.5). Tento protein se účastní umlčování genů pro transkripční faktory exprimované především kmenovými buňkami a časnými progenitory (např. *Lyl1*, *Hhex*, *Bcl11a*). *Bcl11b* dále reprimuje gen *Kit* pro receptor růstového faktoru kmenových buněk a geny související s vývojem NK buněk (*Id2*, *Il2rb*, *Nfil3/E4bp4* a *Plzf/Zbtb16*) (139). Nevratná specifikace do T-lymfocytů vyžaduje represí mnoho dalších časných transkripčních faktorů (mimo *Sp1/PU.1* ještě *Gfi1*, *Bcl11a*, *Lmo2* viz. obrázek č.5). Toto období ale není pouze o inhibici genové transkripce. Stimulace receptoru Notch1 spouští tranzientní produkci molekul charakteristických pro DN2 a DN3 stádia např.  $\alpha$  podjednotku receptoru pro interleukin 2 (CD25; gen *Il2ra*) a pre-Ta řetězec (gen *Ptcra*), dále pak transkripty genů pro receptory *Il7r*, *Notch3* a proteiny negativní zpětné vazby signalizace Notch - *Nrarp* a *Hes1* (140). Zároveň stimulace receptoru Notch a aktivity ostatních transkripčních faktorů (např. *Gata3*) umožňují expresi genů, které bezprostředně souvisí s přeskupováním genů pro TCR (např. *Rag1*, *Rag2*, *Dnnt1*) a jeho signalizací (*Cd3e* a zmíněný *Ptcra*) (141).

Další kapitolu vývoje thymocytů, tedy diferenciaci do stádia DN3a, doprovází omezení produkce povrchové molekuly CD44 a zpomalení proliferace. Zástava proliferace a

diferenciace v období, kdy ještě není exprimován  $\beta$  řetězec TCR, je vynucena transkripčními faktory E2A a Ikaros (142, 143). Velmi rychle poté, co dojde k funkčnímu přeskupení genů pro těžký řetězec TCR a signalizaci zkrze pre-TCR, objevuje se inhibice některých genů stimulovaných činností receptoru Notch1 – např. *Hes1*, *Notch3*, *Il2ra* a *Il7r* (140). Ukazuje se, že se této genové inhibice Notch responzivních genů může účastnit i transkripční faktor Ikaros (144). Po průchodu buněk  $\beta$ -selekcí, dochází k opětovné aktivaci proliferace. Zvýšená proliferace v tomto období se ukazuje jako další způsob, který může sloužit nevratnému nastavení kurzu vývoje do T-lymfocytů, protože dochází k vyřádní regulačních molekul předešlých vývojových stádií (145). V této fázi vývoje se zvyšuje exprese již přepisovaných transkripčních faktorů např. *Ets1*, *Ets2*, *Tcf7* a *Lef1*, které následně mají úlohu v aktivaci exprese kostimulačních molekul T-lymfocytů CD4, CD8, CD27, CD28 ale i adhezních molekul např. CD2, CD5. Buňky následně vstupují do dvojité pozitivního stádia a zahajují mechanismy vedoucí k maturaci lehkého řetězce jejich antigenního receptoru.



**Obrázek č.5:** Schematické znázornění časného vývoje thymocytů. Po vstupu multipotentního progenitoru do thymu dochází k indukci jeho diferenciace skrze stimulaci receptoru Notch1. Vzhledem k absenci konstimulačních molekul CD4 a CD8 se prvotní vývojová stádia thymocytů označují jako tzv. dvojité negativní (DN). Thymocyty stádia ETP neboli DN1 na svém povrchu exprimují molekulu CD44 (CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>). V Další fázi vývoje se transientně přidává exprese molekuly CD25, takže následující stádium DN2 je současně pozitivní na CD44 i CD25. V DN3 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) pak exprese CD44 klesá a jak thymocyty diferencují do stádia DN4 (CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>), mizí i exprese CD25. V tzv. dvojité pozitivním (DP) stádiu thymocyty exprimují CD4 a CD8. **a)** Vývojová osa ukazuje načasování povrchové exprese důležitých receptorů časných thymocytů. **b)** Graf ukazuje načasování exprese některých transkripčních faktorů v průběhu thymocytárního vývoje. Modře jsou označeny ty transkripční faktory, které byly exprimovány ještě před tím, než multipotentní progenitor vstoupil do thymu. Transkripty popsaných genů souvisí především s obdobím časně krvevotvorby a v průběhu vyžívání thymocytů, se jejich exprese aktivně umlčuje. Červeně jsou označeny ty geny, jejichž exprese se zapíná či zesiluje až po vstupu do thymu. Obrázek převzat z publikace (129)



### 6.12 Role ISWI komplexů v nádorové biologii

V současnosti se ukazuje, že až 20% všech nádorových onemocnění nese mutaci v jedné z podjednotek chromatin remodelačních komplexů proteinové rodiny SWI/SNF. Tyto mutace často snižují stabilitu proteinu a způsobují ztrátu dané podjednotky, což vede ke vzniku nekompletního remodelačního komplexu pravděpodobně s odlišnou funkcí *in vivo* a narušenou schopností správně regulovat genovou expresi (146). V případě komplexů podrodiny ISWI byly u nádorových onemocnění také objeveny mutace v jednotlivých podjednotkách ovšem v mnoha případech s doposud neprobádaným významem. Například v genu pro *SMARCA5* bylo pozorováno u 19 729 pacientů s různými onkologickými onemocněními přibližně 1 084 mutací z čehož pouze 186 mutací mělo vliv na sekvenci aminokyselin (viz. <https://dcc.icgc.org/>). Nejlépe popsanou funkční genetickou změnou ve vztahu k podjednotkám ISWI komplexů je amplifikace oblasti dlouhého raménka chromozomu 11 (11q13,5), která byla objevena u vysoce agresivní skupiny buněk ovariálního karcinomu (147). Tato oblast je velká přibližně 1,8 Mbp a obsahuje 13 genů, mezi nimiž se nachází i gen *RSF-1*. Transkripční analýzy potvrdily, že u pacientů se zmíněnou amplifikací chromozomu 11 se, na rozdíl od ostatních 13-ti genů, konzistentně objevuje vysoká intracelulární hladina RSF-1, která koreluje s významně kratším celkovým přežitím onkologických pacientů oproti pacientům s normální hladinou RSF-1 (147-149). Autoři studie popisují, že stabilní vysoká míra exprese genu RSF-1 v nenádorových epitelálních buňkách RK3E indukuje změny charakteristické pro nádorovou transformaci, např. zvyšuje proliferační aktivitu buněk a nezávislost na ukotvení k povrchu kultivační misky (147). Ukazuje se, že amplifikace genu RSF-1 nejen že zvyšuje proliferační aktivitu nádorových buněk, ale zřejmě přispívá i k resistenci buněk ovariálního karcinomu k léčbě (79, 150). Po objevu vzájemného vztahu mezi mírou exprese genu *RSF1* a proliferační aktivitou buněk ovariálního karcinomu se objevily i další publikace, které dávají zvýšené hladiny transkriptu RSF1 do spojitosti s agresivitou nádorového onemocnění. Zvýšené hladiny RSF1 byly pozorovány u karcinomu tlustého střeva (151), malobuněčného karcinomu plic (152) a hepatocelulárního karcinomu (153).

Práce zabývající se studiem buněk ovariálního karcinomu popisují, že umělé zvýšení intracelulární hladiny RSF-1 vede i k současnému zvýšení proteinové úrovně SMARCA5 (154). Není ovšem jednoznačné, zdali zvýšení hladiny proteinu SMARCA5 souvisí s potřebou buňky navodit rovnovážný stav a zajistit bazální molekulární zastoupením jednotlivých remodelačních komplexů (Zvýšení RSF-1 teoreticky může vyvázat podstatnou část molekul ATPázy SMARCA5 a tím inhibovat vznik ostatním komplexům) nebo je to následek vysoké



proliferační aktivity a s ní související dynamické remodelace chromatinové struktury. V každém případě se nefyziologicky zvýšená hladina proteinu SMARCA5 objevuje u některých podtypů rakoviny prsu (155), žaludku (156), hepatocelulárních (157) karcinomů a nádorů odvozených z glií - gliomů (158). Podobně jako u RSF-1, nefyziologicky vysoké hladiny SMARCA5 mohou souviset s agresivitou onemocnění, chemorezistencí a proliferační aktivitou nádorových buněk (158). V případě CD34<sup>+</sup> progenitorů u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) se předpokládá i role v údržbě dediferenciovaného stavu leukemických buněk (2, 92).

Expresí dalších partnerských molekul ISWI ATPáz byla detekována ve zvýšené míře např. protein BPTF v buňkách nemalobuněčného karcinomu plic a plicních adenokarcinomů (159) a v buňkách hepatocelulárního karcinomu (160). Protein WSTF, pokud je jeho hladina uměle zvýšena, podporuje proliferaci, migraci a invazivitu buněčných linií A548 a H1299 odvozených z karcinomu plic (161). Zajímavé je, že i protein TIP5 byl ve zvýšené míře pozorován u nádorových onemocnění a to karcinomu prostaty, kde hladina exprese pozitivně korelovala s nižším přežitím pacientů a vyšší pravděpodobností relapsu onemocnění (162). Autoři práce ukazují, že TIP5 hraje roli především v epigenetickém umlčování genů, jejichž exprese je tlumena při přechodu buněk karcinomu do metastáz. Měření intenzity exprese proteinu TIP5, tak může představovat užitečný nástroj pro zjištění metastatického potenciálu buněk karcinomu prostaty.

### 7 Cíle disertační práce

Naše vědecká skupina se dlouhodobě zabývá studiem transkripčních faktorů, které jsou specifické pro krvetvorbu a regulaci jejich exprese ve vztahu k patogenezi hematologických onemocnění. Dalším zaměřením laboratoře je studium chromatin remodelačních faktorů z proteinové rodiny ISWI *in vivo* s využitím myších modelů s podmíněně deletovatelnou alelou. Tato disertační práce má za cíl propojit obojí tematické zaměření naší laboratoře a získat nové poznatky ohledem role proteinů ISWI v transkripční regulaci fyziologické a maligní krvetvorby.

#### **Jednotlivé cíle disertační práce byly následující:**

- 1) Detailní analýza krvetvorby u myší s podmíněně deletovaným genem pro chromatin remodelační faktor Smarca5 v hematopoietické kmenové buňce.
- 2) Charakterizovat vliv ztráty chromatin remodelujících aktivit zajišťovaných proteinem Smarca5 v průběhu vývoje časných lymfocytárních stádií.
- 3) Studium mechanismů transkripční regulace genu *SP11/PU.1*, které jsou závislé na proteinu SMARCA5, v normální a nádorové hematopoéze
- 4) Analýza vlivu nádorových buněk na časnou hematopoézu u pacientů s malignitami odvozenými z maturovaných B-lymfocytů.

### 8 Výsledky

Disertace se opírá o výsledky čtyř následujících publikací. Publikace jsou přiloženy k této práci a jsou k nalezení na jejím konci (viz. kapitola 13-Přílohy):

(1. *publikace*) Kokavec J, Zikmund T, Savvulidi F, Kulvait V, Edelmann W, Skoultschi A. I, Stopka T, **The ISWI ATPase Smarca5 (Snf2h) is required for proliferation and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells.** *Stem Cells* (2017) 35(6):1614-23. IF: 5.587

(2. *publikace*) Zikmund T, Kokavec J, Turkova T, Savvulidi F, Paszekova H, Vodenkova S, Sedlacek R, Skoultschi A. I, Stopka T, **ISWI ATPase Smarca5 Regulates Differentiation of Thymocytes Undergoing  $\beta$ -Selection** *The Journal of Immunology* (2019) doi: 10.4049/jimmunol.1801684. [Epub ahead of print] IF: 4.856

(3. *publikace*) Dluhosova M, Curik N, Vargova J, Jonasova A, Zikmund T, Stopka T. **Epigenetic Control of SPI1 Gene by CTCF and ISWI ATPase SMARCA5.** *PlosOne* (2014) 9(2):e87448. IF: 3.234

(4. *publikace*) Maswabi BC, Molinsky J, Savvulidi F, Zikmund T, Prukova D, Tuskova D, Klanova M, Vockova P, Lateckova L, Sefc L et al. **Hematopoiesis in patients with mature B cell malignancies is deregulated even in patients with undetectable bone marrow involvement.** *Haematologica* (2017) 102(4):e152-e5. IF: 9.090

Ostatní spoluautorské publikace:

Molinsky J, Maswabi B, Prukova D, Klanova M, Vockova P, Zikmund T, Savvulidi F, Alam M, Sefc L, Vokurka M et al. 2016. **Significantly higher numbers of proB cells in healthy Caucasians compared to Asians: Is there association with incidence of CLL?** *Blood Cells Mol Dis* (2016) 57:118-9. IF: 1.836

## 9 Shrnutí výsledků

### 9.1 (1. publikace) The ISWI ATPase Smarca5 (Snf2h) is required for proliferation and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells.

Genové inaktivační studie naznačují, že jsou chromatin remodelační faktory v mnoha případech důležité pro proliferaci krvetvorných progenitorů a regulaci exprese vývojově specifických genů (163, 164). Například genetické „vypnutí“ enzymatické (ATPázové) aktivity remodelačního faktoru Brg1 vede k narušení transkripce genu pro  $\beta$ -globin, zástavě vývoje erytrocytů a následně anémii vedoucí k smrti mezi 11,5 až 14,5 dnem embryonálního vývoje v myši (165). V předchozích publikacích bylo popsáno, že i remodelační faktor SMARCA5 může být důležitý pro krvetvorbu, protože knockdown tohoto genu vede k narušení proliferace a diferenciaci časných krvetvorných CD34<sup>+</sup> progenitorů *in vitro* (92). Naše laboratoř se trvale zabývá studiem transkripční regulace genů krvetvorby a epigenetickými (chromatinovými) změnami, které doprovází její normální a maligní vývoj. Rozhodli jsme se proto studovat vývojové a expresní změny časných krvetvorných stádií způsobenými ztrátou chromatin remodelačního faktoru Smarca5.

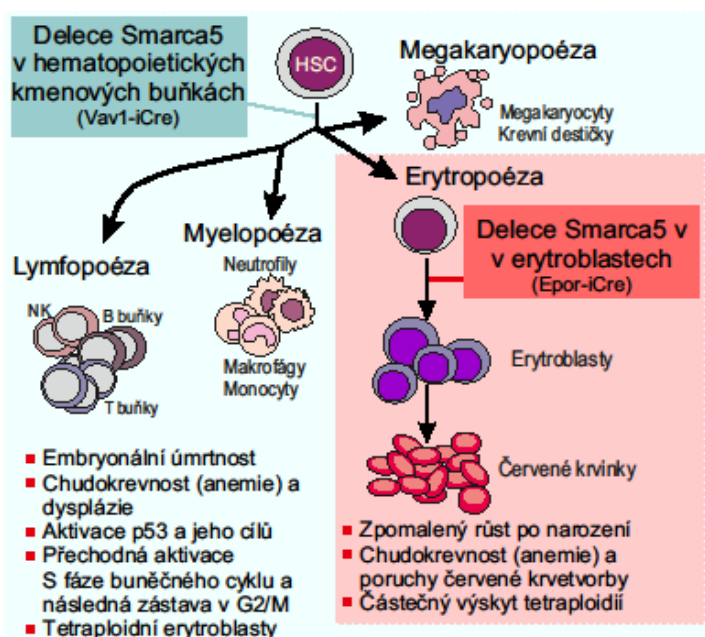
Protein Smarca5 je esenciální pro embryonální vývoj, protože bialelická delece jeho genu vede k úmrtí těsně po implantaci, pátý den embryonálního vývoje myši (92). Vzhledem k tomu, že se hematopoéza u myši objevuje poprvé ve žloutkovém vaku a to přibližně sedmý den embryonálního vývoje (124), není tento tzv. klasický „knock-out“ vhodný pro studium proteinu Smarca5 v krvetvorbě *in vivo*. Z popsaného důvodu jsme v naší laboratoři vytvořili model podmíněné (tzv. „kondiciální“) deletovatelné alely *Smarca5*. Tento experimentální model využívá systému Cre-LoxP a umožňuje specificky deletovat gen v podstatě v jakékoli tkáni (investigátor je pouze limitovaný dostupností transgenních myší s tkáňově specifickou expresí rekombinázy Cre).

Z publikovaných dat vyplývá, že protein Smarca5 hraje důležitou roli především v definitivní erytropoéze. Myši s delecí genu *Smarca5* ve stadiu krvetvorné kmenové buňky (expresi rekombinázy Cre reguloval promotor genu *Vav1*) umíraly 15,5-18,5 den embryonálního vývoje na závažnou anémii (166). Hlavním místem definitivní krvetvorby plodu savců jsou játra. Imunohistopatologie a průtoková cytometrie buněčné suspenze fetálních jater ukázala, že delece genu *Smarca5* způsobuje kumulaci krvetvorných kmenových buněk a snižuje schopnost vytvářet maturovaná stadia erytrocytů. Toto pozorování bylo dále potvrzeno analýzou periferní krve, kdy zvířata s delecí genu měla výrazně nižší počty denuklearných

## Shrnutí výsledků

definitivních erytrocytů. Nejpravděpodobnější příčinou těchto vývojových změn se ukázala obecně vysoká míra apoptózy a dále narušení proliferace a diferenciace především krvetvorných progenitorů LSK ( $\text{Lin}^{-}\text{Sca}^{+}\text{c-Kit}^{+}$ ), LS-K ( $\text{Lin}^{-}\text{Sca}^{-}\text{c-Kit}^{+}$ ) a bazofilních erytroblastů ( $\text{Ter119}^{+}\text{CD71}^{+}$ ). Například *Smarca5* depletované LS-K progenitory obsahovaly vysoké procento tetraploidních buněk, které zřejmě terminálně opustily buněčný cyklus. Toto pozorování by nejenže vysvětlovalo zástavu vývoje progenitorů do více maturovaných stádií erytroidní krevní řady, ale také dysplastické změny jako jsou dvojjaderné proerytroblasty, které byly ve vysoké míře přítomny v játrech knock-outů genu *Smarca5*. Expresní analýza naznačila, že za apoptózou a zástavou buněčného cyklu c-Kit pozitivních progenitorů mohou stát proteiny, jejichž exprese je aktivována transkripčním faktorem p53 v reakci na poškození DNA (např. *Cdkn1a/p21*, *Bax*, *Pmaip/Noxa*, *Bbc3/Puma*). Také u bazofilních erytroblastů byly tyto transkripty detekovány, ale na rozdíl od progenitorů, byl defekt vývoje dále doprovázen sníženou schopností těchto buněk exprimovat důležité erytroidní transkripční faktory (např. *Gata2*, *Klf1* a *Nfe2l3*). U bazofilních erytroblastů byla dále detekována zvýšená exprese embryonálních globinů, což naznačuje, že expresní profil těchto buněk neodpovídá danému vývojovému stádiu a zdá se, že je vůči normálnímu erytroidnímu vývoji ve zpoždění.

*Autorův podíl na publikaci:* Optimalizace analýzy intracelulárních proteinů pomocí průtokové cytometrie. Optimalizace analýzy exprese vybraných genů za pomoci q-PCR, které jsou transkripčně regulované proteinem p53. Chov a genotypování myši exprimujících rekombinázu Cre pod promotorem genu *Vav1*.



### Grafický abstrakt k publikaci (166).

Delece genu *Smarca5* v krvetvorné kmenové buňce způsobuje narušení diferenciace a proliferace hematopoetických progenitorů, zástavu buněčného cyklu ve fázi G2/M u erythroidních a myeloidních progenitorů a narušení genové transkripce. Ve výsledku nedochází k vytvoření dostatečného množství krevních elementů a jedinci bez *Smarca5* předčasně umírají na závažnou anemii v průběhu embryonálního vývoje.

### 9.2 (2. publikace) ISWI ATPase Smarca5 Regulates Differentiation of Thymocytes Undergoing $\beta$ -Selection

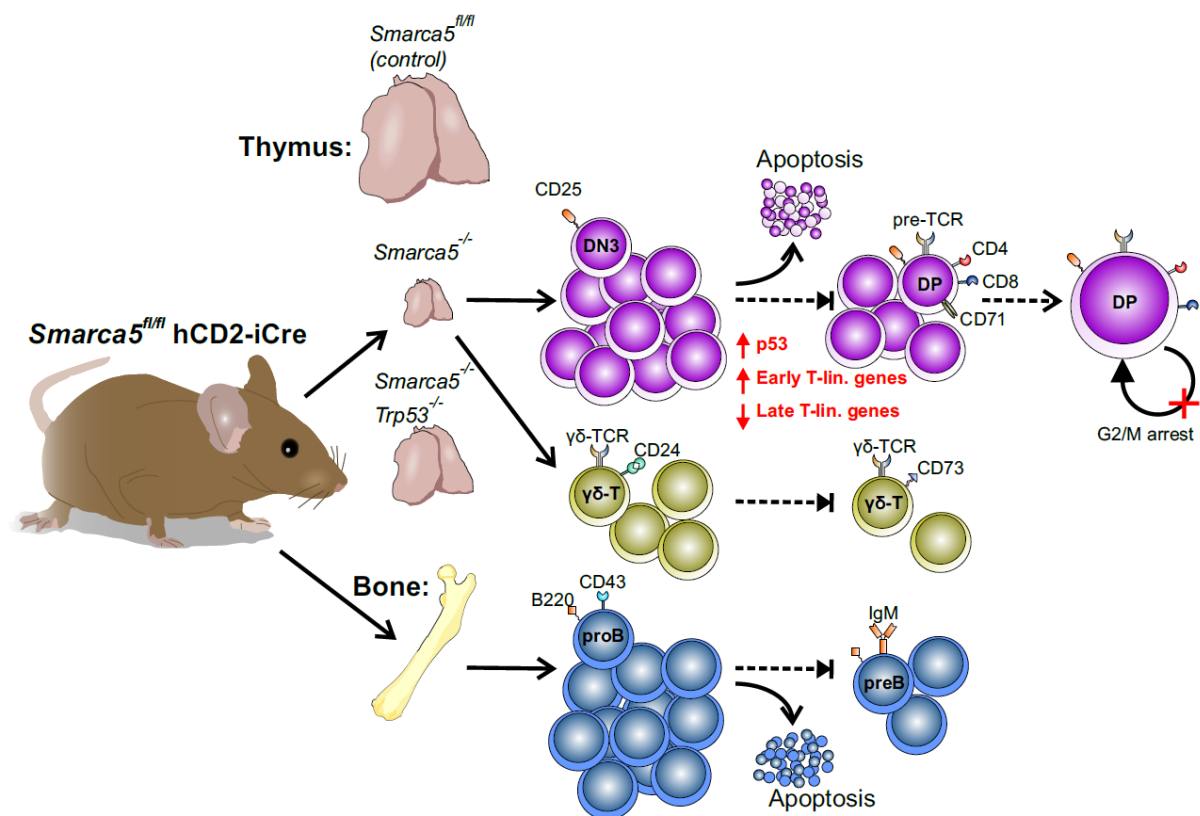
Chromatin remodelační faktory hrají významnou úlohu v maturaci a diferenciaci časných i pozdních vývojových stádií lymfocytů. Nejlépe jsou v tomto ohledu popsány remodelační faktory Chd4 a Brg1 respektive komplexy NuRD a SWI/SNF, ve kterých jsou tyto faktory obsaženy (133, 167). Fenotyp myši s delecí obou remodelačních faktorů specificky v thymocytech vykazuje závažné vývojové abnormality na přechodu z CD4 a CD8 dvojité negativního (DN) do dvojité pozitivního (DP) stádia. Popsaný defekt vývoje má za následek pokles maturovaných T-lymfocytů v periferní krvi a vznik imunodeficitu, který pravděpodobně souvisí se zhoršeným zdravotním stavem těchto myši (134, 168-170). Přes podobnost fenotypu obou myších knockoutů se zdá, že remodelační faktory Chd4 a Brg1 mají trochu odlišné a zřejmě i pro T-lymfocytární vývoj specifické role. Např. se předpokládá, že se protein Brg1 podílí na transkripční represi koreceptorové molekuly CD4 v DN thymocytech (134). Protein Chd4 je spíše přímým aktivátorem exprese CD4, protože jednak interaguje na enhanceru tohoto genu s transkripčním faktorem HEB a histonovou acetyl transferázou p300 (74) a také je schopen v DP thymocytech přinášet histon acetyl-transferázovou aktivitu do transkripčního silenceru genu pro CD4 a tím zrušit jeho inhibiční funkci (73).

Do současnosti existovalo jen velice málo informací o funkci proteinu Smarca5 a jeho komplexů v lymfocytárně specifické remodelaci chromatinu *in vivo*. Domnívali jsme se, že vzhledem k jeho relativně vysoké expresi v lymfocytech v porovnání s ostatními tkáněmi (171), může být tento protein pro lymfocyty a jejich vývoj velmi důležitý. Například homolog, se kterým protein Smarca5 sdílí sekvenci přibližně 80% všech aminokyselin – protein Smarca1, není v lymfocytech prakticky exprimován (171). Experimenty s využitím myši linie T-buněčného lymfomu odhalily, že Smarca5 může v lymfocytech regulovat expresi interleukinů (např. *Il-2*, *Il-3*, *Il-5*) (39) a zřejmě i expresi genů pro podjednotky jejich receptorů. Například v případě  $\alpha$  podjednotky receptoru pro interleukin 2 (*Il-2Ra/CD25*) je exprese regulována skrze interakci Smarca5 s chromatinovým organizátorem *Satb1* (172). Jak už bylo řečeno v úvodu této práce, komplexy se Smarca5 hrají roli v procesu NHEJ (59, 61, 109), což je proces oprav dvojřetězcových zlomů, jenž je nedílnou součástí mechanismu přeskupování V(D)J segmentů pro podjednotky imunitních receptorů. *In vitro* studie na bezbuněčných systémech naznačily, že protein Smarca5 může stimulovat V(D)J rekombinaci také tím, že remodeluje a zřejmě otevírá chromatin (v tomto případě polynukleozomální substrát) pro RAG rekombinázy (173). V předchozí práci jsme ukázali, že je protein Smarca5 důležitý pro krvetvorbu a jeho deplece

vede k vývojovým defektům na úrovni myelo-erytroidních progenitorů a pravděpodobně i na úrovni velmi časných lymfoidních progenitorů ve fetálních játrech (166). Vzhledem k tomu, že do současnosti nebylo jasné jakou fyziologickou úlohu má protein Smarca5 ve výše zmíněných procesech a lymfocytárním vývoji, rozhodli jsme se vytvořit myš s delecí genu pro tento protein na začátku T- a B-buněčného vývoje.

Za účelem studia proteinu Smarca5 v lymfocytech jsme nakřížili kondiciální alelu jeho genu (166) do transgenních zvířat, která exprimovala rekombinázu Cre už od stádia obecného lymfoidního progenitoru (exprese Cre rekombinázy byla regulována promotorem hCD2) (174). Již prvotní analýza fenotypu těchto zvířat naznačovala narušení imunitních funkcí. U přibližně 50% všech samců jsme od třetího měsíce jejich života pozorovali rektální prolapsy jako projev autoimunitního zánětu tlustého střeva a u samic jsme pozorovali sníženou fertilitu (175). S využitím průtokové cytometrie periferní krve a sleziny jsme následně prokázali, že za narušením imunitních funkcí stála lymfopenie, jejíž příčinou byl defekt zrání T a B lymfocytů na úrovni jejich progenitorů v thymu a kostní dřeni. Zjistili jsme, že se defekt zrání T a B lymfocytů časově kryje s kompletní bialelickou delecí genu *Smarca5*, ale také s ukončením přeskupování genových segmentů VDJ těžkých řetězců obou antigenních receptorů (*Tcrb* i *Igh*). Fenotyp byl podobný fenotypu zvířat s mutacemi v genech, které jsou důležité k úspěšnému dokončení VDJ rekombinace nebo k přenosu signálu z pre-TCR (176, 177). S využitím dalších transgeních modelů (např. OT-II a *Rag1*<sup>-/-</sup>) a molekulárně biologických metod jsme vyloučili hypotézu, že by hlavní příčinou defektu zrání thymocytů bylo narušení procesu VDJ rekombinace popřípadě nefunkční signalizace přes pre-TCR. Asi nejvýraznější změnu způsobenou delecí genu *Smarca5* jsme pozorovali na přechodu z thymocytárního stádia DN3 do DN4, kde jsme zaznamenali významnou apoptotickou redukci především postreplikativních buněk, které prošly v S-fázi buněčného cyklu. Ve stádiu DP jsme, podobně jako v případě bazofilních erytroblastů u myši s delecí *Smarca5* v krvetvorné kmenové buňce (166), detekovali významný nárůst tetraploidních buněk. Transkriptomová analýza (RNA-seq) naznačila, že by za vysokou mírou apoptózy a tetraploiditou mohla stát aktivace nádorového supresoru p53. Domnívali jsme se proto, že vyřazením genu pro protein p53 budeme moci odblokovat zástavu vývoje časných vývojových stádií lymfocytů. Analýza dvojitých knockoutů (*Smarca5* a *Trp53*) potvrdila zmírnění závažnosti fenotypu, ovšem pouze u buněčné populace DP thymocytů, u kterých jsme pozorovali nárůst jejich buněčnosti přibližně na dvojnásobek. Další experimenty ukázaly, že za nárůstem populace stálo, spíše než obnovení normálního vývoje a expresního profilu, prodloužení doby přežití aktivně se dělících buněk.

*Autorův podíl na publikaci:* Design a provedení většiny experimentů. Analýza dat a jejich interpretace. Psaní manuskriptu.



**Grafický abstrakt k publikaci (175).** Analýza kostní dřeně a thymocytární buněčné suspenze u experimentálních zvířat s genotypem *Smarca5<sup>fl/fl</sup> hCD2-iCre* odhalila narušení vývoje časných stádií B lymfocytů (narušení diferenciace z proB do preB) a progenitorů T lymfocytů v thymu (narušení diferenciace ze stádia DN3 do DP). U těchto myší byla pozorována zvýšená míra apoptózy zřejmě v důsledku aktivace stresových drah (např. spouštěním transkripce cílových genů proteinu p53) a deregulací exprese vývojově důležitých genů.



### 9.3 (3. publikace) Epigenetic Control of SPI1 Gene by CTCF and ISWI ATPase SMARCA5.

Akutní myeloidní leukémie je onemocnění krvetvorby, které vzniká primárně maligní transformací hematopoetické kmenové buňky (HSC) nebo sekundárně z myelodysplastického syndromu (MDS). Pro toto onemocnění je charakteristické, že se vývoj HSC zastaví na úrovni myeloidních nebo promyelocytárních blastů s úplnou nebo částečnou ztrátou schopnosti diferenciovat. Vzhledem k tomu, že je buněčné dělení leukemických blastů zachováno, může docházet k jejich akumulaci v kostní dřeni a utlačení fyziologické krvetvorby, které se zpravidla projevuje jako periferní cytopenie jedné nebo více krevních řad (obvykle erytroidní, trombocytární nebo granulocytární). Molekulární mechanismy patogeneze AML jsou heterogenní a pravděpodobně souvisí s četnými chromozomálními aberacemi a mutacemi v genech např. pro receptorové tyrozin kinázy (*c-KIT*, *FLT3*), transkripční faktory (*CEBPα*, *WT1*), regulátory epigenetické informace (*MLL*, *TET2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2*, *TET2*, *ASXL1* a *EZH2*) (178).

Naše laboratoř se intenzivně zabývá transkripčním faktorem PU.1 v patogenezi AML. Genetické snížení proteinové hladiny PU.1 vede ke vzniku AML u myši (179). Nízká hladina PU.1 (v porovnání s  $CD34^+$  progenitory zdravých dárců) je charakteristická pro modelovou linii MDS/AML – OCI-M2 a byla také pozorována u  $CD34^+$  progenitorů odvozených z pacientů s MDS s vysokým rizikem přechodu do AML (180). Domníváme se, že jedním z mechanismů patogeneze AML může být neschopnost maligních blastů zvýšit expresi proteinu PU.1 na fyziologickou úroveň a tím jim umožnit diferenciovat do maturovanějších vývojových stádií (180). Protože různé intracelulární koncentrace PU.1 směřují diferenciaci nezralých progenitorů do odlišných krevních řad a specializovaných buněčných typů, musí být míra jeho exprese buňkami přísně regulována. Míra exprese tohoto důležitého transkripčního faktoru krvetvorby je regulována například skrze vazbu některých myeloidních transkripčních faktorů (např. *CEBPα*, *RUNX1*) či samotného PU.1 (181, 182) do promotoru jeho genu nebo oblasti zvané URE (angl. Upstream Regulatory Element) a dalších sekvenčně konzervovaných úseků DNA nacházejících se mezi URE a promotorem (183). Oblast URE je u člověka vzdálená -17,3kb ve směru 5' od transkripčního startu a řídí produkci přibližně 80% veškerého PU.1 v buňce (179). Ukazuje se, že za nízkou hladinou PU.1 u AML mohou stát mutace v transkripčních faktorech, které oblast URE a promotor genu rozeznávají nebo dále delece oblasti URE či její epigenetické umlčení. V této práci jsme se zaměřili na studium epigenetických mechanismů transkripční regulace genu *SPI1/PU.1* v maligních buňkách a

snažili se objasnit roli chromatin remodelačního faktoru SMARCA5 v této regulaci a patogenezi AML.

V počáteční fázi projektu jsme nejprve chtěli zjistit, jakým způsobem může probíhat regulace genové exprese proteinem Smarca5. V minulosti bylo prokázáno, že Smarca5 přináší kohezinový komplex na chromatin (86). Tento komplex je na DNA interfázních buněk lokalizován společně s epigenetickým regulátorem a transkripčním faktorem CTCF a řídí globální genovou expresi a architekturu chromatinu (184). Domnívali jsme se, že by remodelační faktor Smarca5 mohl funkčně spolupracovat s kohezinem popř. transkripčním faktorem Ctfc a regulovat tak genovou expresi vybraných genů včetně *SPII/PU.1*. V minulosti bylo ukázáno, že Ctfc hraje roli v diferenciaci leukemických buněk (185). Rozhodli jsme se proto použít buňky myši erytroleukémie (MEL) a studovat v nich nejprve regulaci exprese lokusu *H19/Igf2*. *H19/Igf2* lokus je znám tím, že se za pomoci epigenetického imprintingu transkripčně umlčí paternální alela genu *H19* a maternální alela genu *Igf2*. Ctfc zde hraje roli represora transkripce. Po vazbě do oblasti, která řídí imprinting (ICR, angl. imprinting control region) způsobí to, že omezí funkční interakci mezi tzv. „zesilovačem“ (angl. enhancer) transkripce a promotorem genu *Igf2* a tento gen pak přestává být exprimován. Protein Ctfc je methylačně senzitivní (186). Pouze maternální alela, která nenes DNA metylaci v oblasti ICR, umožňuje Ctfc se navázat a tím inhibovat expresi genu *Igf2*. Za pomoci chromatinové imunoprecipitace (ChIP) jsme ověřili, že je protein Ctfc přítomen v leukemických buňkách MEL v oblasti ICR lokusu *H19/Igf2*. S využitím stejné metody na kontrolních liniích a liniích s inducibilní proteinovou deplecí jsme ukázali, že i Smarca5 je specificky přítomen v ICR (187). Ko-imunoprecipitační experimenty odhalily, že proteiny Ctfc a Smarca5 spolu fyzicky interagují v myších buňkách MEL ale i v buňkách lidské AML-erythroleukémie K562. Toto pozorování bylo dále potvrzeno za pomoci imunofluorescenční mikroskopie, kdy se jsme pozorovali částečný překryv fluorescenčního signálu Smarca5 se signálem specifickým pro Ctfc v jádrech buněk MEL.

V následujících experimentech jsme testovali, zdali manipulací proteinových hladin SMARCA5 budeme schopni ovlivnit transkripční regulaci zprostředkovanou proteinem CTCF. Pro tento účel jsme použili tři reporterové vektory pIHLE, pIHLME a pIHLIE, které po transfekci do buněk exprimovaly, ať už nezávisle nebo v závislosti na CTCF, gen pro Luciferázu (188, 189). Vektor pIHLE obsahoval pouze promotor genu *H19* a virový SV40 enhancer. Exprese enzymu Luciferáza tak v tomto vektoru nebyla ovlivněna proteinem CTCF. Vektor pIHLIE obsahoval mezi promotorem a enhancerem oblast ICR, která po vazbě proteinu CTCF umožňovala efektivní inhibici transkripce Luciferázy. Plasmid pIHLME byl velice

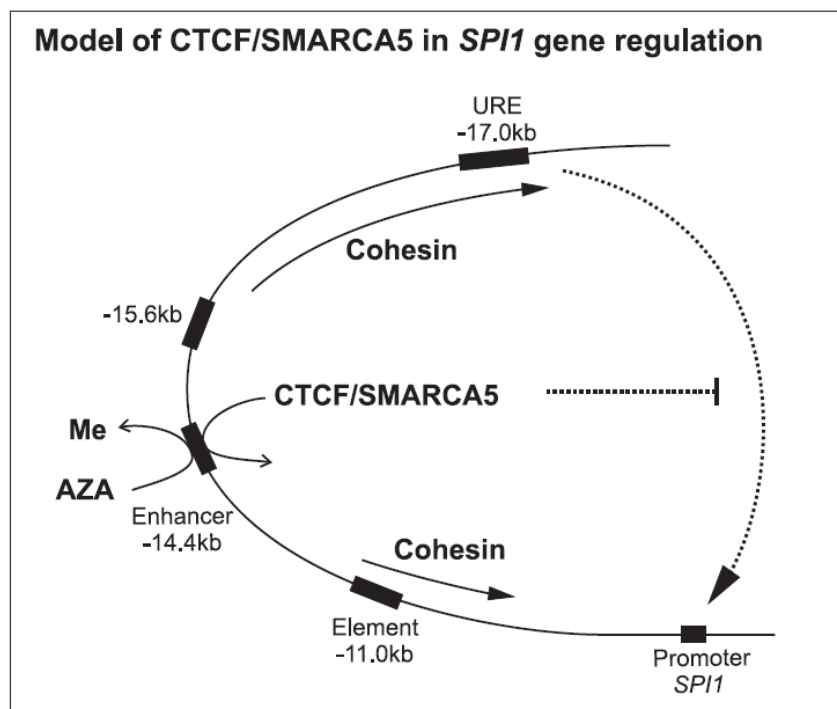
podobný vektoru pIHLIE jen s tím rozdílem, že sekvence, kterou rozeznával protein CTCF, byla v ICR mutována. Experimenty potvrdily, že exprese Luciferázy z vektoru pIHLME je přibližně třikrát vyšší oproti vektoru pIHLIE. Použitím proteinové deplece SMARCA5 nebo CTCF pomocí siRNA jsme zjistili, že se exprese Luciferázy z vektoru pIHLIE zvýší přibližně dvojnásobně, zatímco u vektorů pIHLE a pIHLME se signifikantně nemění. Tato data naznačují, že SMARCA5 kooperuje s proteinem CTCF na ICR a společně zde inhibují interakci enhanceru s promotorem a tím i genovou expresí. Analýza genové exprese buněk MEL toto pozorování dále potvrdila. Deplece proteinu SMARCA5 nebo CTCF v MEL buňkách vyvolala snížení endogenního transkriptu genu *H19* a naopak zvýšení transkriptu genu *Igf2*.

Jak už bylo v předešlých odstavcích nastíněno, hlavním zaměřením projektu bylo určit, zdali se proteiny SMARCA5 a CTCF také spolupodílí na regulaci exprese genů, které přímo souvisí s hematopoézou popřípadě patogenezi AML. Kandidátním genem, na který jsme se zaměřili, byl transkripční faktor a hlavní regulátor myeloidního vývoje - PU.1. Za pomoci chromatinové imunoprecipitace jsme zjistily, že se protein SMARCA5 u myeloidních buněk zdravých dárců vyskytuje na minimálně osmi evolučně vysoce konzervovaných místech, které byly v minulosti popsány jako enhancery transkripce genu *SPII/PU.1* (183). Dále jsme zjistili, že se v některých těchto oblastech SMARCA5 objevuje společně s transkripčním faktorem CTCF. Zajímavé je, že buňky odvozené z AML (linie OCI-M2) měly zcela odlišný vazebný profil obou proteinů. U OCI-M2 jsme např. nebyli schopni detekovat CTCF v oblasti -14.4kb, což je místo s jeho přepokládanou vazebnou sekvencí. Domnívali jsme se, že vazebné rozdíly mezi kontrolními buňkami a buňkami AML blastů mohou být způsobeny vysokou mírou metylace, která je pro linii OCI-M2 typická (180). Tuto hypotézu jsme následně potvrdili. Po použití hypometylačního činidla 5-azacytidinu jsme pozorovali obnovení vazby CTCF do místa -14.4kb a „nově“ se v tomto místě objevil i protein SMARCA5. Vzhledem k tomu, že protein CTCF může být součástí kohezinového komplexu, byla ve zmíněných regulačních oblastech genu *SPII/PU.1* studována také přítomnost proteinů kohezinového komplexu – SMC1 a RAD21. S pomocí chromatinové imunoprecipitace jsme pozorovali vazbu obou kohezinových proteinů ve studovaných regulačních oblastech genu *SPII/PU.1* a jejich navázání bylo závislé na metylaci DNA. Přítomnost obou proteinů však nebyla pozorována v oblasti -14.4kb. Tato data ukazují, že se proteiny CTCF a SMARCA5 specificky váží do oblasti -14.4kb enhanceru genu *SPII/PU.1*. Vazba obou proteinů je ovšem velmi závislá na metylaci DNA ale pravděpodobně nezávislá na kohezinovém komplexu.

Pro detailnější popis vztahu mezi metylací DNA v oblasti enhanceru -14.4kb a vazbou CTCF do tohoto místa, byla zvolena metoda sekvenování PCR produktů vzniklých

amplifikací bisulfitem upravené genomické DNA. Cílem bylo určit methylační status genomické DNA CD34<sup>+</sup> buněk, které byly odvozené z pacientů s AML a porovnat jej s methylačním statusem zdravých dárců. U savců představují potenciální místa methylace DNA sekvence CG dinukleotidů. Celkem se v enhanceru -14.4kb a vazebném konsenzu proteinu CTCF objevuje přibližně deset CG dinukleotidů (190), které byly metodou bisulfitové konverze studovány. Zjistili jsme, že se u zdravých dárců procento methylace těchto CG dinukleotidů pohybuje mezi 0-30%, ovšem u progenitorů odvozených z MDS/AML je toto procento výrazně vyšší a to přibližně mezi 60-90%. Methylace enhanceru -14.4kb se podobně jako u OCI-M2 linií ukázala být specifická, protože v případě vzorků genomické DNA z pacientů léčených 5-azacytidinem byla míra methylace výrazně nižší a u některých CG dinukleotidů dokonce na úrovni kontrol. Výsledky naznačovaly, že specifická vazba proteinů SMARCA5 a CTCF do regulačních oblastí genu *SP11/PU.1*, může souviset s tím, že se tyto proteiny přímo účastní regulace exprese transkripčního faktoru PU.1. Pro ověření této hypotézy byla buněčná linie lidského AML (OCI-M2) transfekována současně dvěma vektory. První nesl kódující sekvenci genu CTCF (pCTCF) nebo siRNA proti SMARCA5 a druhý nesl kódující sekvenci pro zelený fluorescenční protein (GFP). Buňky pozitivní na GFP byly druhý den odsortovány na průtokovém cytometru a lyzáty z nich použity pro detekci proteinových hladin PU.1 a SMARCA5 použitím metody Western-blot. Výsledky ukázaly, že v případě první transfekce (po zvýšení intracelulární hladiny proteinu CTCF) došlo ke snížení hladiny PU.1 i po použití hypomethylačního činidla 5-azacytidinu. Ve druhém případě (tj. po snížení intracelulární hladiny SMARCA5) se koncentrace PU.1 v buňkách zvýšila. Podle těchto výsledků usuzujeme, že přítomnost proteinů SMARCA5 a CTCF v enhanceru -14.4 inhibuje transkripci genu *SP11/PU.1*.

*Autorův podíl na publikaci:* Analýza a interpretace dat z kvantitativní PCR



**Teoretický model regulace exprese genu *SPI1/PU.1* transkripčním faktorem CTCF a SMARCA5. (187).** V buňkách akutní myeloidní leukémie je sekvenční pro transkripční faktor CTCF na pozici -14.4kb methylována. Aby se protein CTCF společně se SMARCA5 mohl do této oblasti navázat, musí být methylace odstraněna např. aplikací činidla 5-azacytidin. Po navázání CTCF a SMARCA5 na pozici -14.4kb dochází k inhibici transkripce genu *SPI1/PU.1* a to zřejmě tak, že CTCF blokuje vznik chromatinových smyček tzn. brání prostorovému přiblížení regulačních elementů zvyšujících transkripci s promotorem genu *SPI1/PU.1*. Chromatinová precipitace odhalila přítomnost proteinů kohezinového komplexu v této oblasti. Tyto proteiny zřejmě slouží k zajištění chromatinových smyček před rozpojením poté, co dojde k jejich vytvoření.

### 9.4 (4. publikace) Hematopoiesis in patients with mature B cell malignancies is deregulated even in patients with undetectable bone marrow involvement.

Statisticky nejčastějším typem hematologických onemocnění u dospělých jsou nádory odvozené z maturovaných B-lymfocytů. U těchto onemocnění je obvyklé, že u nemocného pacienta detekujeme jeden převládající klon nádorové buňky s identicky přeskupenými genovými segmenty genu pro těžký řetězec imunoglobulinu - IGH. Expanze nádorového klonu se stejnou genovou přestavbou dlouhou dobu naznačovala, že k příčinám nádorové transformace a vzniku onemocnění musí docházet až poté, co se multipotentní progenitor krvetvorby specifikuje do lymfoidního a dále do B-buněčného progenitoru. V současnosti však bylo publikováno několik prací, které tuto hypotézu vyvrací. Zmíněné práce s využitím transplantačních experimentů ukazují, že změny predisponující ke vzniku malignit odvozených z maturovaných B-buněk jsou pravděpodobně přítomné už na úrovni krvetvorné kmenové buňky a krvetvorných progenitorů (191-193). Na základě těchto pozorování jsme usuzovali, že u pacientů s B-buněčnými malignitami budeme schopni detekovat rozdíly v časně hematopoéze oproti zdravým jedincům.

Jedním z cílů této studie bylo proto porovnat absolutní a relativní zastoupení jednotlivých časných vývojových stádií krvetvorby u kontrolních dárců a pacientů s FL, DLBCL, MCL, CLL, MM před léčbou (194). Analýza vývojových stádií potvrdila již publikovaná pozorování, a to že relativní počet krvetvorných kmenových buněk (HSC) a multipotentních progenitorů (MPP) se u zdravých jedinců s věkem spíše nemění, zatímco procento multilymfoidních progenitorů (MLP) roste významně a procento progenitorů B-lymfocytů klesá (195). Průtoková cytometrie kostní dřeně následně odhalila, že k věkově závislému zvýšení procenta MLP u onkologických pacientů nedochází. Populace MLP byla celkově nižší a to dokonce i u těch pacientů, u kterých nebyla detekována infiltrace kostní dřeně maligními B-lymfocyty. Tato data naznačují, že snížená schopnost vytvářet MLP je buď vnitřní vlastností kmenových buněk či progenitorů nemocných např. z důvodu genových mutací, anebo nádorové buňky dokáží z extramedulárních oblastí ovlivnit časnou hematopoézu “na dálku” např. vylučováním cytokinů, růstových faktorů a jiných buněčných působků. Kvantitativní měření mRNA potvrdilo, že HSC z pacientů diferenciaciálně exprimují některé vývojově důležité geny oproti zdravým dárcům. Např. byla pozorována vyšší exprese transkripčních faktorů, které jsou specifické pro časnou lymfoidní diferenciaci (*SP1*, *BCL11A*, *NOTCH1* a *IKZF1*), což naznačuje, že i přes nižší počty MLP, může být diferenciaci HSC pacientů posunuta směrem k tvorbě progenitorů B-

## Shrnutí výsledků

---

lymfocytů. Bude potřeba provést ještě další experimenty, které odhalí, jakými způsoby jsou přesně regulovány buněčné populace HSC a MLP, ale v současnosti je zřejmé, že přítomnost maligních B-lymfocytů má na tyto populace významný vliv (192, 196). Inhibice regulace populací HSC a MLP nádorovými buňkami, především v případě, pokud by se potvrdilo, že umožní snížit závažnost popř. progresi onemocnění, tak může do budoucna představovat důležitý terapeutický cíl.

*Autorův podíl na publikaci:* V přípravách čtvrté publikace, která vznikla ve spolupráci s laboratoří Doc. MUDr. Pavla Klenera, Ph.D., jsem provedl veškeré optimalizace izolace mRNA, přepisu do cDNA a analýzy genové exprese z malého počtu sortovaných buněk.

### 10 Diskuze

Vývoj tkání je obvykle doprovázen snižováním přístupnosti chromatinové struktury, kdy se otevřený chromatin časných stádií progenitorů v průběhu diferenciaci více zneprístupňuje a přechází do stavu umožňujícího genovou expresi odpovídající pouze profilu konkrétního buněčného typu. Důležitými iniciátory expresních změn v progenitorech krvetvorby jsou transkripční faktory, které „čtou“ genetickou informaci uloženou v sekvenci DNA a do regulačních oblastí responzivních genů přináší chromatin remodelační aktivity. Společná souhra obou epigenetických aktivit poté umožňuje zahájit, potlačit popřípadě udržovat určitou míru exprese specifických genů, která je nezbytná pro zajištění fyziologických buněčných procesů a současně umožňuje vytvoření terminálního fenotypu krevních elementů.

S využitím myšího modelu podmíněné delecí, který jsme vytvořili naší vědeckou skupinou, jsme my se svými spolupracovníky ukázali, že se tkáňově a vývojově specifické regulace transkripce účastní i chromatin remodelační faktor *Smarca5*. Delece genu *Smarca5* v progenitorech granulárních neuronů má za následek defekty arborizace dendritů Purkyňovo buněk mozečku a desátý den po narození vede k narušení exprese až 2 900 genů (95). V případě vyvíjejícího se oka se po delecí objevuje až 1 461 rozdílně exprimovaných transkriptů (96). Analýza transkriptomu dvojité pozitivní (DP) thymocytů za pomoci metody mRNA-seq odhalila až 3 318 rozdílně exprimovaných transkriptů (175). U c-Kit<sup>+</sup> krvetvorných progenitorů a kmenových buněk sortovaných z fetálních jater (E14.5) myši s genotypem *Smarca5*<sup>-cKO</sup> Vav1-iCre jsme pozorovali narušenou expresi mnoha desítek genů, které souvisely především s odpovědí na poškození DNA a erythroidní diferenciací (166). Zjistili jsme, že společným prvkem transkripčních analýz a současně možným vysvětlením vývojových defektů způsobených delecí genu *Smarca5* je, že se u podstatné části transkripčních faktorů terminální diferenciaci neaktivuje jejich exprese do fyziologické míry. Například v krvetvorbě jsme pozorovali nízké hladiny klíčových transkripčních faktorů erythroidního (*Gata1*, *Gata2*, *Klf1*, *Nfe2l3*) a thymocytárního vývoje (*Klf7*, *Ets2*, *Irf3*, *Bcl6*). Zajímavé je, že myši s delecí *Smarca5* v HSC umíraly kolem dne E17,5 na závažnou anémii a měly tedy velmi podobný fenotyp jako jedinci s delecí některých transkripčních faktorů červené krevní řady např. *Klf1* (197). Je proto otázkou, zdali protein *Smarca5* nehraje přímou úlohu v regulaci exprese transkripčních faktorů časného vývoje.

Protein *Smarca5* může ať už přímo či nepřímo přes své partnerské molekuly v remodelačních komplexech interagovat s celou řadou transkripčních faktorů a epigenetických regulátorů (viz. <https://thebiogrid.org/114045/summary/homo-sapiens/smarca5.html>). Díky



mnohačetným interakcím s dalšími vazebnými molekulami možná není ani tak překvapivé, že delece jeho genu způsobí velké změny v expresním profilu krvetvorných progenitorů. Například na myších epiteliálních buňkách bylo ukázáno, že více jak 32% všech míst, které protein Smarca5 rozeznává, tvoří promotorové oblasti kódujících genů (28). Tato pozorování naznačují, že regulace exprese proteinem Smarca5 může být jednou z jeho hlavních funkcí. Ovšem mechanismy regulace genové exprese proteinem Smarca5 a hlavně interakční partneři, kteří se společně se Smarca5 regulace genů krvetvorby účastní, byly do této doby popsány jen částečně. V buňkách myši erythroleukémie byla například popsána fyzická interakce Smarca5 s transkripčním faktorem GATA-1, který je esenciální pro vývoj červených krvinek, megakaryocytů, eozinofilů a žírných buněk (198). V naší práci jsme ukázali, že SMARCA5 může fyzicky interagovat s transkripčním faktorem CTCF v regulačních oblastech jednoho z hlavních regulátorů myeloidního vývoje genu *SP11/PU.1* a oblasti, která řídí imprinting (ICR) genů *H19* a *Igf2* (187). Popsali jsme, že je protein SMARCA5 zcela nezbytný pro vazbu CTCF do chromatinu ICR v leukemických buňkách. Oba proteiny společně inhibují funkci enhanceru ICR, čímž ve výsledku stimulují transkripci genu *H19* a naopak umlčují expresi genu *Igf2*.

Jaký je ale mechanismus společné regulace exprese genů zmíněnými proteiny SMARCA5 a CTCF? Na tuto otázku nelze jednoduše odpovědět, protože jen u samotného proteinu CTCF bylo popsáno mnoho odlišných způsobů regulace genové exprese (199). Tento protein může fungovat jako přímý aktivátor či represor transkripce v promotorech některých genů. Zároveň může nasedat do tzv. izolátorových oblastí (angl. insulators), ve kterých umožňuje inra- popřípadě inter-chromozomální interakce (např. v oblasti řídícího exprese lokusu myšího  $\beta$ -globinu), může bránit spojení mezi enhancerem a protomotorem určitých genů (viz. ICR lokusu *H19/Igf2*) či vytvářet bariéru mezi euchromatinem a konstitutivním heterochromatinem (199). V minulosti bylo opakovaně ukázáno, že se CTCF objevuje v genomických oblastech, které se shodují s místy vazby proteinů kohezinového komplexu (86, 189), což naznačují i naše data. Zjistili jsme, že se po podání 5-azacytidinu proteiny SMARCA5, CTCF a zástupci kohezinového komplexu (RAD21 a SMC1) objevují v regulačních oblastech genu *SP11/PU.1* (především v URE a -11kb). Domníváme se, že přítomnost kohezinu v těchto oblastech může mít podobnou funkci jako v případě regulace transkripce genů *H19* a *Igf2*, tedy stabilizace chromozomálních smyček vytvořených proteinem CTCF (200). Dále jsme pozorovali, že se SMARCA5 a CTCF (už bez kohezinových proteinů) společně váží do oblasti -14.4kb genu *SP11/PU.1*, kde se za normálních okolností nevyskytují. Vzhledem k tomu, že SMARCA5 i CTCF mají po podání hypometylačního činidla na expresi genu *SP11/PU.1* negativní vliv, domníváme se, že vazba proteinů do tohoto enhanceru bude

souviset s inhibicí transkripce. Přestože naše data zcela neobjasňují molekulární mechanismus regulace transkripce, ukazují, že za patologických podmínek mohou proteiny SMARCA5 a CTCF společně inhibovat expresi genu *SP11/PU.1*. Proteiny SMARCA5 a CTCF blokují enhancer i po aplikaci hypometylační terapie, čímž mohou přispívat k udržování dediferencovaného stavu leukemických buněk.

Současné studie metodou ChIP-seq ukazují, že více jak 35% všech míst genomu rozeznávaných proteinem Smarca5 může být současně rozeznáno i transkripčním faktorem Ctfc (28). Ctfc ovšem není jedinou molekulou, v jejímž vazebném konsenzu se ATPáza Smarca5 může vyskytovat (97, 201). Ukazuje se, že se může jednat až o desítky různých transkripčních faktorů, které vyžadují enzymatickou aktivitu proteinu Smarca5 pro nasednutí do svých sekvenčně specifických míst genomu (97). Otázka tedy zní, jaké molekulární změny protein Smarca5 generuje v místech rozeznávaných transkripčními faktory? Ukazuje se, že ve vazebných místech může Smarca5 fungovat jako jakési molekulární pravítko pro zachování stejných rozestupů mezi jednotlivými nukleozómy (97, 201). Např. pro okolí vazebných míst již zmíněného transkripčního faktoru Ctfc je charakteristické pole 20-ti velmi uspořádaných nukleozomů, jejichž organizace a pravidelné rozestupy se naruší po depleci Smarca5 (97, 201). Vazebná místa vykazují po depleci Smarca5 také vyšší nukleozomální obsazenost a sníženou schopnost vázat Ctfc a proteiny kohezinového komplexu (201). Ve výsledku nedostatek remodelačních aktivit negativně ovlivňuje i globální tvorbu chromatinových smyček a izolaci genomických oblastí s určitým prostorovým uspořádáním označované jako topologicky sdružené domény (TAD, angl. topologically associating domain) (97). Zajímavé je, že deplece partnerských molekul ACF1, RSF1, TIP5 a WSTF popsanou dezorganizaci nukleozomálního uspořádání nevyvolává, což opět může naznačovat, že remodelační komplexy ISWI mohou být redundantní ve svých biologických funkcích (201). V souhrnu, za výraznými expresními změnami u myši s kondiciální delecí genu *Smarca5* tedy může stát snížená schopnost vývojově důležitých transkripčních faktorů navázat se do regulačních oblastí řídících tkáňově specifickou transkripci a diferenciaci.

Další významnou fenotypovou změnou, kterou jsme v krvetvorbě našich zvířecích modelů pozorovali, bylo narušení proliferace, zástava buněčného cyklu a aktivace signálních drah spojených s poškozením DNA. Popsali jsme, že delecce genu *Smarca5* v hematopoetických kmenových buňkách postihuje definitivní krvetvorbu ve fetálních játrech a fenotypové projevy v podobě anémie jsou patrné už v den E13,5 embryonálního vývoje. Embryonální vývoj byl v důsledku narušené časně krvetvorby a erytropoézy předčasně ukončen nejpozději 17,5 den po oplození a to prakticky u všech postihnutých jedinců. Zjistili jsme, že jedinci s delecí *Smarca5*

mají v játrech mnohem více buněk populace LSK. Toto pozorování si vysvětlujeme především jejich zvýšenou proliferační aktivitou, ale současně omezenou schopností jednotlivých subpopulací LSK (krvetočných kmenových buněk a multipotentních progenitorů) diferencovat. Porucha vývoje už na úrovni kmenových buněk a následných multipotentních progenitorech byla potvrzena transplantačními experimenty s využitím suspenze z fetálních jater embryonálního dne E13,5. U letálně ozářených příjemců jsme ani po 12 dnech od transplantace nepozorovali (na rozdíl od buněk fetálních jater z kontrolních jedinců) obnovu krvetvorby.

Buňky, které v krvetvořném vývoji prošly až do stádia LS-K tedy liniově předurčených stádií, proliferovaly sice podobně jako jejich kontrolní protějšky ale objevovala se u nich nefyziologická zástava v G2/M fázi buněčného cyklu. Popsanou zástavu jsme pozorovali také u vyvíjejících se basofilních erythroblastů a thymocytů, kde tetraploidní buňky tvořily téměř jednu čtvrtinu všech buněk DP populace. Zajímavým zjištěním je, že jsme tento specifický buněčný fenotyp související s delecí genu *Smarca5* nedetekovali na žádné jiné úrovni vývoje a to ani u ostatních krevních elementů např. B-lymfocytů. Podobně nebyla zástava v G2/M fázi pozorována ani v průběhu vývoje mozečku a oční čočky (95, 96). Obvykle je opuštění buněčného cyklu v tetraploidním stavu spojeno s kumulací závažných chromozomálních změn např. s nemožností dokončit replikaci či opravit poškození DNA vzniklých v průběhu replikace. V minulosti bylo několikrát ukázáno, že se protein SMARCA5 účastní v remodelačních komplexech ACF1 a WSTF replikace DNA a to v průběhu její pozdní fáze (42, 53, 54). Data, která jsme získali z analýzy buněčného cyklu DN thymocytů by toto mohla také naznačovat. U DN3 thymocytů jsme například pozorovali, že stejné procento buněk jako u kontrol vstupuje normálním způsobem do S fáze, ale počty postreplikativních buněk, které se mitoticky rozdělily, byly oproti kontrole výrazně nižší (přibližně 3x). Tento fenotyp ani tetraploiditu DP populace „nezachránila“ delece genu pro hlavního strážce genomu – protein p53. Kumulace nefyziologických chromatinových změn tak zřejmě vede k neschopnosti thymocytů, multipotentních progenitorů, vyvíjejících se erythrocytů a progenitorů dalších tkání úspěšně dokončit S-fázi buněčného cyklu, což může ve výsledku vést až k jejich terminálnímu (a na p53 nezávislému) zastavení v tetraploidním stavu nebo indukci apoptózy.

Jak již bylo zmíněno v předešlých odstavcích, u jedinců s delecí *Smarca5* v krvetvořné kmenové buňce se objevoval nárůst absolutního počtu buněk stádia LSK zřejmě v důsledku inhibice diferenciací. Zjistili jsme, že k tomuto nárůstu nejvíce přispívalo zvýšení počtu subpopulace multipotentních progenitorů s myelolymfoidním potenciálem (LSK<sup>+</sup>CD48<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>). V další části našeho výzkumu jsme se tedy zaměřili na to, zdali delece

*Smarca5* nebude mít také vliv na diferenciaci a časný vývoj lymfocytů. Vývoj T lymfocytárních progenitorů, který se uskutečňuje v thymu (brzlíku) a vývoj B lymfocytárních progenitorů, který se uskutečňuje v kostní dřeni, jsou jednou z nejvíce studovaných oblastí krvetvorby. Vývojové události obou buněčných linií jsou v současnosti velmi podrobně popsány a charakterizují je specifické změny exprese povrchových molekul, aktivují se různé mechanismy řízení buněčného cyklu a uskutečňuje se (na rozdíl od myeloidní řady) programované vytváření dvouvláknových zlomů při vyžívání antigenního receptoru. Právě iniciace dvouvláknových zlomů a jejich následné opravy umožňují testovat funkce chromatin remodelačních faktorů v procesech oprav poškození DNA *in vivo* (102).

Ukázali jsme, že protein *Smarca5* a chromatin remodelační aktivita s ním spojená, je velice důležitá pro fyziologický vývoj  $\alpha\beta$  i  $\gamma\delta$  thymocytů a časných B lymfocytů. Zajímavým zjištěním bylo, že se vývoj  $\alpha\beta$  thymocytů prakticky zastavil na úrovni DN3 stádia a v případě časných B lymfocytů na úrovni CD25 negativních pro-B buněk. Popsaný fenotyp velice připomínal fenotyp zvířat s mutacemi v genech, které jsou důležité k úspěšnému dokončení V(D)J rekombinace nebo k přenosu signálu z pre-TCR (176, 177). Pro vyloučení hypotézy, že by hlavní příčinou zástavy thymocytárního vývoje mohl být problém v zahájení V(D)J rekombinace nebo ve spojování přerušovaných konců, jsme použili myš s transgenním konstruktem OT-II. Tato myš exprimuje již přeskupené geny pro těžký (*Tcrb*) i lehký (*Tcra*) řetězec T lymfocytárního receptoru, který páruje s CD4 koreceptorem a rozeznává peptid odvozený z molekuly kuřecího ovalbuminu (202). Expres tohoto konstruktu v thymocytech vede k aktivaci alelické exkluze a silné inhibici V(D)J rekombinace endogenních oblastí genů imunitního receptoru. Domnívali jsme se, že by inhibice vývojově determinovaného vzniku poškození DNA mohla částečně zlepšit fenotypové změny způsobené delecí *Smarca5* jako v případě genů oprav DNA (203). Naše data z průtokové cytometrie tuto hypotézu nakonec nepotvrdila. Provedená transkriptomová analýza naznačila, že hlavní příčina vývojového bloku thymocytů zřejmě neleží v narušení mechanismu přeskupování genů pro jednotlivé řetězce TCR a v defektu vyžívání antigenního receptoru, ale spíše v narušení exprese vývojově důležitých genů.

Jak již bylo podrobně popsáno v literárním přehledu této práce, významnou část remodelačních aktivit vykonává protein *Smarca5* v komplexu se svými vazebnými partnery. Závažné vývojové změny krvetvorby mohou být připsány tomu, že se ztrátou ATPázové podjednotky, buňka ztratí i veškeré chromatin remodelační aktivity, které jsou zajišťovány jí obsahujícími proteinovými komplexy. Snad nejlépe fenotypu myších modelů delece *Smarca5* v krvetvorbě odpovídá fenotyp myši s delecí *Bptf*. Podobně jako u *Smarca5* knockoutů, delece

Bptf vede k defektům diferenciaci krvetvorných kmenových buněk a neschopnosti těchto buněk rekonstituovat normální hematopoézu v letálně ozářených příjemcích (115). Myši velmi rychle umírají na selhání kostní dřeně a závažnou anémii. Další podobností je, že ztráta Bptf způsobuje snížení exprese transkripčních faktorů souvisejících s diferenciací kmenových buněk do progenitorů jednotlivých krevních řad (*Meis1*, *Pbx1*, *Mnl*, *Lmo2*) (115). Delece *Bptf* má výrazný vliv i na vývoj thymocytů především na maturaci DP thymocytů do SP stádií (113). Myši ovšem vykazují oproti fenotypu našeho myšního modelu určité rozdíly. Nezdá se například, že by u nich byl narušen vývoj DN3 stádia, ve kterém probíhá  $\beta$ -selekce. V DP stádiu se nevyskytují tetraploidní buňky a defekty proliferace, což naznačuje, že protein Bptf zastává ve vyvíjejících se tymocytech jiné funkce nebo pouze část funkcí zajišťovaných také proteinem Smarca5 (113). Dále byl thymocytární vývoj studován u myši s delecí genů *Acfl/Baz1a* (tvoří se Smarca5 komplexy ACF a CHRAC) (83, 102) a *Tip5/Baz2a* (komplex NoRC) (83). U obou myších modelů ovšem nebylo prokázáno viditelné narušení lymfocytárního vývoje. Dalšími kandidátními geny pro studium ISWI remodelačních komplexů, které ještě v krvetvorbě nebyly studovány, jsou *Wstf/Baz1b* a *Rsf-1*. Fenotyp homozygotních jedinců s delecí prvního z nich je neonatálně letální (103, 104) a druhého je embryonálně letální (83). Vzhledem k variabilitě fenotypů myši s delecí genů v jednotlivých podjednotkách ISWI komplexů je zřejmé, že konkrétní ISWI komplexy jsou esenciální pro vývoj některých specifických struktur, avšak v ostatních tkáních mohou být jejich funkce vzájemně zastoupeny. Vzhledem k omezenému množství současných dat bude nutné provést ještě další experimenty, které umožní rozlišit, zdali příčinou fenotypu myši s delecí Smarca5 v lymfocytech a červené krevní řadě je ztráta funkce všech remodelačních komplexů rodiny ISWI nebo čistě ztráta remodelační aktivity faktoru Smarca5 nezávisle na těchto komplexech.

Celkově data našeho a ostatních vědeckých týmů ukazují, že protein Smarca5 umožňuje časným progenitorům nejen nastavit jejich diferenciační transkripční programy, ale současně se podílí na zajišťování buněčných mechanismů důležitých pro jejich efektivní proliferaci. Příčinou většiny hematologických onemocnění včetně AML spočívá právě v inhibici schopnosti progenitorů se vyvíjet a diferenciovat do terminálně maturovaných stádií, přičemž schopnost proliferovat si tyto buňky zachovávají. Naše laboratoř v minulosti ukázala, že zvýšená hladina SMARCA5 se objevuje u CD34<sup>+</sup> krvetvorných progenitorů u pacientů s AML a po dosažení kompletní remise tato hladina klesá (2). Nabízí se tedy otázka, zdali inhibice enzymatické aktivity proteinu Smarca5 či inhibice interakce s jeho vazebnými partnery nepovede k zastavení proliferace nádorových buněk krvetvorby popřípadě k indukci jejich diferenciaci. Tuto hypotézu podporuje i mnoho studií, které využívají siRNA technologii pro

depleci Smarca5 a partnerských molekul v buněčných liniích odvozených z různých nádorů *in vitro*. Deplece Smarca5 zpomaluje dělení a navozuje zástavu buněčného cyklu například v liniích odvozených z gliomů (158), karcinomu prsu (155) a hepatocelulárního karcinomu (157). Autoři dále popisují, že se deplecí remodelačního faktoru snižuje rezistence nádorových buněk k chemoterapii a jejich invazivita (158). Podobný dopad na proliferaci nádorových buněk má i deplece Smarca1 (204, 205) či deplece některých interakčních partnerů ISWI ATPáz například BPTF u linií derivovaných z adenokarcinomů a hepatocelulárních karcinomů (50, 159, 160) a TIP5 u linií karcinomu prostaty (162). Vzhledem k obtížné použitelnosti metody siRNA pro inhibici exprese ISWI ATPáz a jejich interakčních partnerů v leukemických buňkách *in vivo*, je snaha vytvořit jejich chemické inhibitory. V současnosti byl například popsán inhibitor bromodomény proteinu BPTF s označením DCB29 (206). Přestože autoři tento inhibitor netestovali na živých buňkách, domnívají se, že ovlivní či zabráni interakci proteinu BPTF s jeho substrátem tj. acetylovanými histony v promotorech aktivních genů, čímž ve výsledku může negativně narušit i genovou expresi nádorových buněk. Nově byl popsán i inhibitor ATPázové domény ISWI proteinů, který autoři testovali na liniích odvozených z AML (207). V této práci popisují (a potvrzují tak naši hypotézu), že inhibice enzymatické aktivity proteinu SMARCA5 způsobuje snížení proliferace leukemických buněk a jejich terminální diferenciaci do granulo-monocytární řady, zatímco exponenciální růst normálních CD34+ kmenových buněk a progenitorů je zachován. Zajímavé je, že inhibici proliferace autoři pozorují také u linií s nulovou alelou genu *TP53*. Tato data částečně odpovídají i observaci u našeho myšího modelu, kde proliferační zástava lymfoidních progenitorů v důsledku ztráty Smarca5 závisí na proteinu p53 jen částečně či vůbec.

Indukce diferenciací (pre)leukemických blastů je důležitou součástí terapie pacientů s AML a MDS. Dochází k ní v důsledku globální hypometylace DNA po podání inhibitorů enzymu DNMT1 (5-azacytidin a také decitabin), zřejmě jako následek obnovení fyziologické exprese hlavních transkripčních faktorů myeloidního vývoje PU.1, RUNX1 a CEBP $\alpha$  (180). Data, která přinášíme, ukazují, že protein SMARCA5 je inhibitorem exprese genu *SPI1/PU.1* v leukemických buňkách (187). Zvýšení exprese PU.1 na fyziologickou úroveň, tak může představovat jeden z mechanismů, kterým bude možné inhibováním enzymatické aktivity SMARCA5 indukovat diferenciaci buněk akutní myeloidní leukémie. Dále by bylo zajímavé otestovat, zdali budou nádorové buňky po podání inhibitoru SMARCA5 také více senzitivní na indukci dvouvláknového poškození DNA jako po depleci s použitím siRNA (59-63). Podáním inhibitoru SMARCA5 by pak bylo teoreticky možné např. zkrátit dobu ozařování zhoubných nádorů v průběhu radioterapie. V souhrnu, SMARCA5 je důležitá molekula pro nádorový růst

## Diskuze

---

a může představovat důležitý terapeutický cíl v léčbě hematologických a jiných nádorových onemocnění.

### 11 Závěr

#### 1) Detailní analýza krve tvorby u myši s podmíněně deletovaným genem pro chromatin remodelační faktor *Smarca5* v hematopoietické kmenové buňce.

Potvrdili jsme, že chromatin remodelující aktivity proteinu *Smarca5* jsou důležité pro časnou krev tvorbu a maturaci erytrocytů *in vivo*. Jednou z hlavních příčin narušení hematopoézy po deleci genu *Smarca5* se ukázala být zástava krev tvorných buněk na úrovni multipotentních LSK progenitorů (MPP) v G2/M fázi buněčného cyklu. Za touto zástavou buněčné proliferace a s ní související vysokou mírou apoptózy byla pravděpodobně zodpovědná aktivace signální dráhy proteinu p53. Výsledky experimentů naznačily, že by protein *Smarca5* mohl být důležitý nejen pro nastavení genové exprese v průběhu definitivní erythropoézy, ale i pro vývoj ostatních myeloidních krev ních řad odvozených z hematopoietické kmenové buňky.

#### 2) Charakterizovat vliv ztráty chromatin remodelujících aktivit zajišťovaných proteinem *Smarca5* v průběhu vývoje časných lymfocytárních stádií.

Zjistili jsme, že delece genu *Smarca5* má také zásadní vliv na lymfocytární vývoj. Delecí genu *Smarca5* byla narušena diferenciace časných stádií  $\alpha\beta$  thymocytů (ze stádia DN3 do stádia DN4),  $\gamma\delta$  T-lymfocytů (do stádia CD73<sup>+</sup>) a B-lymfocytů v kostní dřeni (ze stádia pro-B do pre-B). Vyloučili jsme, že by hlavním důvodem narušení vývoje časných lymfocytárních progenitorů byla neschopnost buněk přeskupit geny pro jejich antigenní receptory. Narušení lymfocytárního vývoje doprovázela vysoká míra apoptózy a proliferační defekty. Pouze u DP stádia thymocytů jsme pozorovali zástavu v G2/M fázi buněčného cyklu. U tohoto stádia jsme detekovali výrazné změny v expresním profilu, které by mohly být příčinou vývojových změn. Využití myšího modelu s nulovou alelou genu *Trp53* se však neprokázalo, že by za apoptózou a zástavou buněčného cyklu stála aktivace signální dráhy proteinu p53. Protein *Smarca5* tak zřejmě hraje důležitou roli v nastavení časných expresních programů souvisejících s diferenciací lymfoidních progenitorů.



### **3) Studium mechanismů transkripční regulace genu *SPII/PU.1*, které jsou závislé na proteinu SMARCA5, v normální a nádorové hematopoéze.**

Popsali jsme, že proteiny SMARCA5 a CTCF spolu za fyziologických podmínek interagují v oblasti, která řídí imprinting (ICR) genů *H19* a *Igf2*. Vazba proteinu CTCF do oblasti ICR je závislá na proteinu SMARCA5 a zprostředkovává snížení exprese *Igf2* a naopak zvýšení exprese genu *H19*. Dále bylo ukázáno, že oba proteiny spolu interagují i v regulačních oblastech genu *SPII/PU.1*, kde regulují úroveň exprese tohoto hlavního transkripčního faktoru myeloidního vývoje. Interakce obou proteinů je silně závislá na methylovači DNA a v případě buněčných linií odvozených z AML, které mají typicky regulační oblasti genu *SPII/PU.1* silně methylovány, je tato interakce omezena pouze na promotor tohoto genu. Zjistili jsme, že po aplikaci hypometylačního činidla dochází k obnovení interakcí mezi SMARCA5 a CTCF v regulačních oblastech genu *SPII/PU.1* (např. oblast -11kb), ke kterým normálně dochází za fyziologických podmínek. V případě AML linií se dále objevila ještě další interakce obou proteinů a to v oblasti -14,4kb. Následné experimenty naznačili, že SMARCA5 i CTCF vazbou do oblasti -14,4kb inhibují expresi genu *SPII/PU.1*. Domníváme se, že vazba proteinů SMARCA5 a CTCF do oblasti -14,4kb zřejmě pomáhá blastům odvozeným z AML snížit expresi transkripčního faktoru PU.1 a tím udržovat leukemické buňky v dediferencovaném stavu.

### **4) Analýza vlivu nádorových buněk na časnou hematopoézu u pacientů s malignitami odvozenými z maturovaných B-lymfocytů.**

Prokázali jsme, že u pacientů s nádory odvozenými z maturovaných B-lymfocytů, dochází k narušení časně krvevorby a to i v případě, že tito pacienti nemají detekovatelnou infiltraci kostní dřeně. Pozorovali jsme celkově nižší procento multilymfoidních progenitorů (MLP) v kostní dřeni pacientů a narušení exprese některých vývojově důležitých genů u kmenových buněk.

## 12 Seznam použité literatury

1. Stopka T, Skoultschi AI. The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development. *P Natl Acad Sci USA*. 2003;100(24):14097-102.
2. Stopka T, Zakova D, Fuchs O, Kubrova O, Blafkova J, Jelinek J, et al. Chromatin remodeling gene SMARCA5 is dysregulated in primitive hematopoietic cells of acute leukemia. *Leukemia*. 2000;14(7):1247-52.
3. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997;389(6648):251-60.
4. Richmond TJ, Davey CA. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*. 2003;423(6936):145-50.
5. Sivolob A, Prunell A. Linker histone-dependent organization and dynamics of nucleosome entry/exit DNAs. *J Mol Biol*. 2003;331(5):1025-40.
6. Liu CL, Kaplan T, Kim M, Buratowski S, Schreiber SL, Friedman N, et al. Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. *PLoS Biol*. 2005;3(10):e328.
7. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
8. Cairns BR. Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14(11):989-96.
9. Neigeborn L, Carlson M. Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1984;108(4):845-58.
10. Fairman-Williams ME, Guenther UP, Jankowsky E. SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol*. 2010;20(3):313-24.
11. Clapier CR, Iwasa J, Cairns BR, Peterson CL. Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(7):407-22.
12. Lazzaro MA, Picketts DJ. Cloning and characterization of the murine Imitation Switch (ISWI) genes: differential expression patterns suggest distinct developmental roles for Snf2h and Snf2l. *J Neurochem*. 2001;77(4):1145-56.
13. Clapier CR, Cairns BR. Regulation of ISWI involves inhibitory modules antagonized by nucleosomal epitopes. *Nature*. 2012;492(7428):280-4.
14. Boyer LA, Latek RR, Peterson CL. The SANT domain: a unique histone-tail-binding module? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(2):158-63.
15. Grune T, Brzeski J, Eberharder A, Clapier CR, Corona DF, Becker PB, et al. Crystal structure and functional analysis of a nucleosome recognition module of the remodeling factor ISWI. *Mol Cell*. 2003;12(2):449-60.
16. Clapier CR, Langst G, Corona DF, Becker PB, Nightingale KP. Critical role for the histone H4 N terminus in nucleosome remodeling by ISWI. *Mol Cell Biol*. 2001;21(3):875-83.
17. Oppikofer M, Bai T, Gan Y, Haley B, Liu P, Sandoval W, et al. Expansion of the ISWI chromatin remodeler family with new active complexes. *EMBO Rep*. 2017;18(10):1697-706.
18. Thompson PJ, Norton KA, Niri FH, Dawe CE, McDermid HE. CECR2 is involved in spermatogenesis and forms a complex with SNF2H in the testis. *J Mol Biol*. 2012;415(5):793-806.
19. He X, Fan HY, Garlick JD, Kingston RE. Diverse regulation of SNF2h chromatin remodeling by noncatalytic subunits. *Biochemistry*. 2008;47(27):7025-33.
20. Eberharder A, Vetter I, Ferreira R, Becker PB. ACF1 improves the effectiveness of nucleosome mobilization by ISWI through PHD-histone contacts. *EMBO J*. 2004;23(20):4029-39.

21. Jones MH, Hamana N, Nezu J, Shimane M. A novel family of bromodomain genes. *Genomics*. 2000;63(1):40-5.
22. Goodwin LR, Picketts DJ. The role of ISWI chromatin remodeling complexes in brain development and neurodevelopmental disorders. *Mol Cell Neurosci*. 2018;87:55-64.
23. Dhalluin C, Carlson JE, Zeng L, He C, Aggarwal AK, Zhou MM. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. *Nature*. 1999;399(6735):491-6.
24. Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci*. 1995;20(2):56-9.
25. Zhou Y, Grummt I. The PHD finger/bromodomain of NoRC interacts with acetylated histone H4K16 and is sufficient for rDNA silencing. *Curr Biol*. 2005;15(15):1434-8.
26. Fyodorov DV, Kadonaga JT. Binding of Acf1 to DNA involves a WAC motif and is important for ACF-mediated chromatin assembly. *Mol Cell Biol*. 2002;22(18):6344-53.
27. Doerks T, Copley R, Bork P. DDT -- a novel domain in different transcription and chromosome remodeling factors. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(3):145-6.
28. Morris SA, Baek S, Sung MH, John S, Wiench M, Johnson TA, et al. Overlapping chromatin-remodeling systems collaborate genome wide at dynamic chromatin transitions. *Nat Struct Mol Biol*. 2014;21(1):73-81.
29. Sala A, Toto M, Pinello L, Gabriele A, Di Benedetto V, Ingrassia AM, et al. Genome-wide characterization of chromatin binding and nucleosome spacing activity of the nucleosome remodelling ATPase ISWI. *EMBO J*. 2011;30(9):1766-77.
30. Santos-Rosa H, Schneider R, Bernstein BE, Karabetsov N, Morillon A, Weise C, et al. Methylation of histone H3 K4 mediates association of the Isw1p ATPase with chromatin. *Mol Cell*. 2003;12(5):1325-32.
31. Li H, Ilin S, Wang W, Duncan EM, Wysocka J, Allis CD, et al. Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature*. 2006;442(7098):91-5.
32. Wysocka J, Swigut T, Xiao H, Milne TA, Kwon SY, Landry J, et al. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. *Nature*. 2006;442(7098):86-90.
33. Li J, Langst G, Grummt I. NoRC-dependent nucleosome positioning silences rRNA genes. *EMBO J*. 2006;25(24):5735-41.
34. Hanai K, Furuhashi H, Yamamoto T, Akasaka K, Hirose S. RSF governs silent chromatin formation via histone H2Av replacement. *PLoS Genet*. 2008;4(2):e1000011.
35. Guetg C, Lienemann P, Sirri V, Grummt I, Hernandez-Verdun D, Hottiger MO, et al. The NoRC complex mediates the heterochromatin formation and stability of silent rRNA genes and centromeric repeats. *EMBO J*. 2010;29(13):2135-46.
36. Postepska-Igielska A, Krunić D, Schmitt N, Greulich-Bode KM, Boukamp P, Grummt I. The chromatin remodelling complex NoRC safeguards genome stability by heterochromatin formation at telomeres and centromeres. *EMBO Rep*. 2013;14(8):704-10.
37. Culver-Cochran AE, Chadwick BP. Loss of WSTF results in spontaneous fluctuations of heterochromatin formation and resolution, combined with substantial changes to gene expression. *BMC Genomics*. 2013;14:740.
38. He X, Fan HY, Narlikar GJ, Kingston RE. Human ACF1 alters the remodeling strategy of SNF2h. *J Biol Chem*. 2006;281(39):28636-47.
39. Precht P, Wurster AL, Pazin MJ. The SNF2H chromatin remodeling enzyme has opposing effects on cytokine gene expression. *Mol Immunol*. 2010;47(11-12):2038-46.
40. Alenghat T, Yu J, Lazar MA. The N-CoR complex enables chromatin remodeler SNF2H to enhance repression by thyroid hormone receptor. *EMBO J*. 2006;25(17):3966-74.

41. Ewing AK, Attner M, Chakravarti D. Novel regulatory role for human Acf1 in transcriptional repression of vitamin D3 receptor-regulated genes. *Mol Endocrinol*. 2007;21(8):1791-806.
42. Bozhenok L, Wade PA, Varga-Weisz P. WSTF-ISWI chromatin remodeling complex targets heterochromatic replication foci. *EMBO J*. 2002;21(9):2231-41.
43. Cavellan E, Asp P, Percipalle P, Farrants AK. The WSTF-SNF2h chromatin remodeling complex interacts with several nuclear proteins in transcription. *J Biol Chem*. 2006;281(24):16264-71.
44. Percipalle P, Fomproix N, Cavellan E, Voit R, Reimer G, Kruger T, et al. The chromatin remodelling complex WSTF-SNF2h interacts with nuclear myosin 1 and has a role in RNA polymerase I transcription. *EMBO Rep*. 2006;7(5):525-30.
45. Strohner R, Nemeth A, Jansa P, Hofmann-Rohrer U, Santoro R, Langst G, et al. NoRC--a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *EMBO J*. 2001;20(17):4892-900.
46. Santoro R, Li J, Grummt I. The nucleolar remodeling complex NoRC mediates heterochromatin formation and silencing of ribosomal gene transcription. *Nat Genet*. 2002;32(3):393-6.
47. Barak O, Lazzaro MA, Lane WS, Speicher DW, Picketts DJ, Shiekhhattar R. Isolation of human NURF: a regulator of Engrailed gene expression. *EMBO J*. 2003;22(22):6089-100.
48. Kwon SY, Grisan V, Jang B, Herbert J, Badenhorst P. Genome-Wide Mapping Targets of the Metazoan Chromatin Remodeling Factor NURF Reveals Nucleosome Remodeling at Enhancers, Core Promoters and Gene Insulators. *PLoS Genet*. 2016;12(4):e1005969.
49. Qiu Z, Song C, Malakouti N, Murray D, Hariz A, Zimmerman M, et al. Functional interactions between NURF and Ctf regulate gene expression. *Mol Cell Biol*. 2015;35(1):224-37.
50. Richart L, Carrillo-de Santa Pau E, Rio-Machin A, de Andres MP, Cigudosa JC, Lobo VJS, et al. BPTF is required for c-MYC transcriptional activity and in vivo tumorigenesis. *Nat Commun*. 2016;7:10153.
51. Erdel F, Rippe K. Chromatin remodelling in mammalian cells by ISWI-type complexes--where, when and why? *FEBS J*. 2011;278(19):3608-18.
52. McNairn AJ, Gilbert DM. Epigenomic replication: linking epigenetics to DNA replication. *Bioessays*. 2003;25(7):647-56.
53. Collins N, Poot RA, Kukimoto I, Garcia-Jimenez C, Dellaire G, Varga-Weisz PD. An ACF1-ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nat Genet*. 2002;32(4):627-32.
54. Poot RA, Bozhenok L, van den Berg DL, Steffensen S, Ferreira F, Grimaldi M, et al. The Williams syndrome transcription factor interacts with PCNA to target chromatin remodelling by ISWI to replication foci. *Nat Cell Biol*. 2004;6(12):1236-44.
55. Sugimoto N, Yugawa T, Iizuka M, Kiyono T, Fujita M. Chromatin remodeler sucrose nonfermenting 2 homolog (SNF2H) is recruited onto DNA replication origins through interaction with Cdc10 protein-dependent transcript 1 (Cdt1) and promotes pre-replication complex formation. *J Biol Chem*. 2011;286(45):39200-10.
56. Bryant KF, Colgrove RC, Knipe DM. Cellular SNF2H chromatin-remodeling factor promotes herpes simplex virus 1 immediate-early gene expression and replication. *MBio*. 2011;2(1):e00330-10.
57. Zhou J, Chau CM, Deng Z, Shiekhhattar R, Spindler MP, Schepers A, et al. Cell cycle regulation of chromatin at an origin of DNA replication. *EMBO J*. 2005;24(7):1406-17.
58. Polo SE, Jackson SP. Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: a focus on protein modifications. *Genes Dev*. 2011;25(5):409-33.

59. Lan L, Ui A, Nakajima S, Hatakeyama K, Hoshi M, Watanabe R, et al. The ACF1 complex is required for DNA double-strand break repair in human cells. *Mol Cell*. 2010;40(6):976-87.
60. Nakamura K, Kato A, Kobayashi J, Yanagihara H, Sakamoto S, Oliveira DV, et al. Regulation of homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination. *Mol Cell*. 2011;41(5):515-28.
61. Toiber D, Erdel F, Bouazoune K, Silberman DM, Zhong L, Mulligan P, et al. SIRT6 recruits SNF2H to DNA break sites, preventing genomic instability through chromatin remodeling. *Mol Cell*. 2013;51(4):454-68.
62. Smeenk G, Wiegant WW, Marteijs JA, Luijsterburg MS, Sroczynski N, Costelloe T, et al. Poly(ADP-ribosyl)ation links the chromatin remodeler SMARCA5/SNF2H to RNF168-dependent DNA damage signaling. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 4):889-903.
63. Min S, Jo S, Lee HS, Chae S, Lee JS, Ji JH, et al. ATM-dependent chromatin remodeler Rsf-1 facilitates DNA damage checkpoints and homologous recombination repair. *Cell Cycle*. 2014;13(4):666-77.
64. Erdel F, Rippe K. Binding kinetics of human ISWI chromatin-remodelers to DNA repair sites elucidate their target location mechanism. *Nucleus*. 2011;2(2):105-12.
65. Klement K, Luijsterburg MS, Pinder JB, Cena CS, Del Nero V, Wintersinger CM, et al. Opposing ISWI- and CHD-class chromatin remodeling activities orchestrate heterochromatic DNA repair. *J Cell Biol*. 2014;207(6):717-33.
66. Oliveira DV, Kato A, Nakamura K, Ikura T, Okada M, Kobayashi J, et al. Histone chaperone FACT regulates homologous recombination by chromatin remodeling through interaction with RNF20. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 4):763-72.
67. Price BD, D'Andrea AD. Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell*. 2013;152(6):1344-54.
68. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Sedelnikova OA, Solier S, et al. GammaH2AX and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(12):957-67.
69. Atsumi Y, Minakawa Y, Ono M, Dobashi S, Shinohe K, Shinohara A, et al. ATM and SIRT6/SNF2H Mediate Transient H2AX Stabilization When DSBs Form by Blocking HUWE1 to Allow Efficient gammaH2AX Foci Formation. *Cell Rep*. 2015;13(12):2728-40.
70. Fradet-Turcotte A, Canny MD, Escibano-Diaz C, Orthwein A, Leung CC, Huang H, et al. 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature*. 2013;499(7456):50-4.
71. Chou DM, Adamson B, Dephoure NE, Tan X, Nottke AC, Hurov KE, et al. A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(43):18475-80.
72. Kato A, Komatsu K. RNF20-SNF2H Pathway of Chromatin Relaxation in DNA Double-Strand Break Repair. *Genes (Basel)*. 2015;6(3):592-606.
73. Xiao A, Li H, Shechter D, Ahn SH, Fabrizio LA, Erdjument-Bromage H, et al. WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature*. 2009;457(7225):57-62.
74. LeRoy G, Loyola A, Lane WS, Reinberg D. Purification and characterization of a human factor that assembles and remodels chromatin. *J Biol Chem*. 2000;275(20):14787-90.
75. Helfricht A, Wiegant WW, Thijssen PE, Vertegaal AC, Luijsterburg MS, van Attikum H. Remodeling and spacing factor 1 (RSF1) deposits centromere proteins at DNA double-strand breaks to promote non-homologous end-joining. *Cell Cycle*. 2013;12(18):3070-82.
76. Pessina F, Lowndes NF. The RSF1 histone-remodelling factor facilitates DNA double-strand break repair by recruiting centromeric and Fanconi Anaemia proteins. *PLoS Biol*. 2014;12(5):e1001856.

77. Loyola A, LeRoy G, Wang YH, Reinberg D. Reconstitution of recombinant chromatin establishes a requirement for histone-tail modifications during chromatin assembly and transcription. *Genes Dev.* 2001;15(21):2837-51.
78. Yang H, Zhang T, Tao Y, Wu L, Li HT, Zhou JQ, et al. *Saccharomyces cerevisiae* MHF complex structurally resembles the histones (H3-H4)(2) heterotetramer and functions as a heterotetramer. *Structure.* 2012;20(2):364-70.
79. Choi JH, Sheu JJ, Guan B, Jinawath N, Markowski P, Wang TL, et al. Functional analysis of 11q13.5 amplicon identifies Rsf-1 (HBXAP) as a gene involved in paclitaxel resistance in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2009;69(4):1407-15.
80. Sheu JJ, Guan B, Choi JH, Lin A, Lee CH, Hsiao YT, et al. Rsf-1, a chromatin remodeling protein, induces DNA damage and promotes genomic instability. *J Biol Chem.* 2010;285(49):38260-9.
81. Perpelescu M, Nozaki N, Obuse C, Yang H, Yoda K. Active establishment of centromeric CENP-A chromatin by RSF complex. *J Cell Biol.* 2009;185(3):397-407.
82. Martens JH, O'Sullivan RJ, Braunschweig U, Opravil S, Radolf M, Steinlein P, et al. The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. *EMBO J.* 2005;24(4):800-12.
83. Dickinson ME, Flenniken AM, Ji X, Teboul L, Wong MD, White JK, et al. High-throughput discovery of novel developmental phenotypes. *Nature.* 2016;537(7621):508-14.
84. Chang EY, Ferreira H, Somers J, Nusinow DA, Owen-Hughes T, Narlikar GJ. MacroH2A allows ATP-dependent chromatin remodeling by SWI/SNF and ACF complexes but specifically reduces recruitment of SWI/SNF. *Biochemistry.* 2008;47(51):13726-32.
85. Pehrson JR, Fried VA. MacroH2A, a core histone containing a large nonhistone region. *Science.* 1992;257(5075):1398-400.
86. Hakimi MA, Bochar DA, Schmiesing JA, Dong Y, Barak OG, Speicher DW, et al. A chromatin remodelling complex that loads cohesin onto human chromosomes. *Nature.* 2002;418(6901):994-8.
87. Parelho V, Hadjur S, Spivakov M, Leleu M, Sauer S, Gregson HC, et al. Cohesins functionally associate with CTCF on mammalian chromosome arms. *Cell.* 2008;132(3):422-33.
88. Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, et al. Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. *Nature.* 2008;451(7180):796-801.
89. Prasad P, Lennartsson A, Ekwall K. The roles of SNF2/SWI2 nucleosome remodeling enzymes in blood cell differentiation and leukemia. *Biomed Res Int.* 2015;2015:347571.
90. Yip DJ, Corcoran CP, Alvarez-Saavedra M, DeMaria A, Rennick S, Mears AJ, et al. Snf2l regulates Foxg1-dependent progenitor cell expansion in the developing brain. *Dev Cell.* 2012;22(4):871-8.
91. Barak O, Lazzaro MA, Cooch NS, Picketts DJ, Shiekhhattar R. A tissue-specific, naturally occurring human SNF2L variant inactivates chromatin remodeling. *J Biol Chem.* 2004;279(43):45130-8.
92. Stopka T, Skoultschi AI. The ISWI ATPase Snf2h is required for early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14097-102.
93. Chong S, Vickaryous N, Ashe A, Zamudio N, Youngson N, Hemley S, et al. Modifiers of epigenetic reprogramming show paternal effects in the mouse. *Nat Genet.* 2007;39(5):614-22.
94. Daxinger L, Harten SK, Oey H, Epp T, Isbel L, Huang E, et al. An ENU mutagenesis screen identifies novel and known genes involved in epigenetic processes in the mouse. *Genome Biol.* 2013;14(9):R96.

95. Alvarez-Saavedra M, De Repentigny Y, Lagali PS, Raghu Ram EV, Yan K, Hashem E, et al. Snf2h-mediated chromatin organization and histone H1 dynamics govern cerebellar morphogenesis and neural maturation. *Nat Commun.* 2014;5:4181.
96. He S, Limi S, McGreal RS, Xie Q, Brennan LA, Kantorow WL, et al. Chromatin remodeling enzyme Snf2h regulates embryonic lens differentiation and denucleation. *Development.* 2016;143(11):1937-47.
97. Barisic D, Stadler MB, Iurlaro M, Schubeler D. Mammalian ISWI and SWI/SNF selectively mediate binding of distinct transcription factors. *Nature.* 2019;569(7754):136-40.
98. Lazzaro MA, Pepin D, Pescador N, Murphy BD, Vanderhyden BC, Picketts DJ. The imitation switch protein SNF2L regulates steroidogenic acute regulatory protein expression during terminal differentiation of ovarian granulosa cells. *Mol Endocrinol.* 2006;20(10):2406-17.
99. Martens M. Developmental and cognitive troubles in Williams syndrome. *Handb Clin Neurol.* 2013;111:291-3.
100. Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, Mezaki Y, Uematsu Y, Matsui D, et al. The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome. *Cell.* 2003;113(7):905-17.
101. Fusco C, Micale L, Augello B, Teresa Pellico M, Menghini D, Alfieri P, et al. Smaller and larger deletions of the Williams Beuren syndrome region implicate genes involved in mild facial phenotype, epilepsy and autistic traits. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(1):64-70.
102. Dowdle JA, Mehta M, Kass EM, Vuong BQ, Inagaki A, Egli D, et al. Mouse BAZ1A (ACF1) is dispensable for double-strand break repair but is essential for averting improper gene expression during spermatogenesis. *PLoS Genet.* 2013;9(11):e1003945.
103. Ashe A, Morgan DK, Whitelaw NC, Bruxner TJ, Vickaryous NK, Cox LL, et al. A genome-wide screen for modifiers of transgene variegation identifies genes with critical roles in development. *Genome Biol.* 2008;9(12):R182.
104. Yoshimura K, Kitagawa H, Fujiki R, Tanabe M, Takezawa S, Takada I, et al. Distinct function of 2 chromatin remodeling complexes that share a common subunit, Williams syndrome transcription factor (WSTF). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(23):9280-5.
105. Banting GS, Barak O, Ames TM, Burnham AC, Kardel MD, Cooch NS, et al. CECR2, a protein involved in neurulation, forms a novel chromatin remodeling complex with SNF2L. *Hum Mol Genet.* 2005;14(4):513-24.
106. Footz TK, Brinkman-Mills P, Banting GS, Maier SA, Riazi MA, Bridgland L, et al. Analysis of the cat eye syndrome critical region in humans and the region of conserved synteny in mice: a search for candidate genes at or near the human chromosome 22 pericentromere. *Genome Res.* 2001;11(6):1053-70.
107. Dawe CE, Kooistra MK, Fairbridge NA, Pisio AC, McDermid HE. Role of chromatin remodeling gene *Cecr2* in neurulation and inner ear development. *Dev Dyn.* 2011;240(2):372-83.
108. Fairbridge NA, Dawe CE, Niri FH, Kooistra MK, King-Jones K, McDermid HE. *Cecr2* mutations causing exencephaly trigger misregulation of mesenchymal/ectodermal transcription factors. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010;88(8):619-25.
109. Sanchez-Molina S, Mortusewicz O, Bieber B, Auer S, Eckey M, Leonhardt H, et al. Role for hACF1 in the G2/M damage checkpoint. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(19):8445-56.
110. Zaghlool A, Halvardson J, Zhao JJ, Etemadikhah M, Kalushkova A, Konska K, et al. A Role for the Chromatin-Remodeling Factor BAZ1A in Neurodevelopment. *Hum Mutat.* 2016;37(9):964-75.
111. Sun H, Damez-Werno DM, Scobie KN, Shao NY, Dias C, Rabkin J, et al. ACF chromatin-remodeling complex mediates stress-induced depressive-like behavior. *Nat Med.* 2015;21(10):1146-53.

112. Goller T, Vauti F, Ramasamy S, Arnold HH. Transcriptional regulator BPTF/FAC1 is essential for trophoblast differentiation during early mouse development. *Mol Cell Biol.* 2008;28(22):6819-27.
113. Landry J, Sharov AA, Piao Y, Sharova LV, Xiao H, Southon E, et al. Essential role of chromatin remodeling protein Bptf in early mouse embryos and embryonic stem cells. *PLoS Genet.* 2008;4(10):e1000241.
114. Landry JW, Banerjee S, Taylor B, Aplan PD, Singer A, Wu C. Chromatin remodeling complex NURF regulates thymocyte maturation. *Genes Dev.* 2011;25(3):275-86.
115. Xu B, Cai L, Butler JM, Chen D, Lu X, Allison DF, et al. The Chromatin Remodeler BPTF Activates a Stemness Gene-Expression Program Essential for the Maintenance of Adult Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2018;10(3):675-83.
116. Koludrovic D, Laurette P, Strub T, Keime C, Le Coz M, Coassolo S, et al. Chromatin-Remodelling Complex NURF Is Essential for Differentiation of Adult Melanocyte Stem Cells. *PLoS Genet.* 2015;11(10):e1005555.
117. Frey WD, Chaudhry A, Slepicka PF, Ouellette AM, Kirberger SE, Pomerantz WCK, et al. BPTF Maintains Chromatin Accessibility and the Self-Renewal Capacity of Mammary Gland Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2017;9(1):23-31.
118. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(12).
119. Orkin SH, Zon LI. SnapShot: hematopoiesis. *Cell.* 2008;132(4):712.
120. Medvinsky A, Dzierzak E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell.* 1996;86(6):897-906.
121. Ottersbach K, Dzierzak E. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. *Dev Cell.* 2005;8(3):377-87.
122. Eilken HM, Nishikawa S, Schroeder T. Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature.* 2009;457(7231):896-900.
123. Chen MJ, Li Y, De Obaldia ME, Yang Q, Yzaguirre AD, Yamada-Inagawa T, et al. Erythroid/myeloid progenitors and hematopoietic stem cells originate from distinct populations of endothelial cells. *Cell Stem Cell.* 2011;9(6):541-52.
124. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell.* 2008;132(4):631-44.
125. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell.* 2005;121(7):1109-21.
126. Cabezas-Wallscheid N, Klimmeck D, Hansson J, Lipka DB, Reyes A, Wang Q, et al. Identification of regulatory networks in HSCs and their immediate progeny via integrated proteome, transcriptome, and DNA methylome analysis. *Cell Stem Cell.* 2014;15(4):507-22.
127. Shah DK, Zuniga-Pflucker JC. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J Immunol.* 2014;192(9):4017-23.
128. Teague TK, Tan C, Marino JH, Davis BK, Taylor AA, Huey RW, et al. CD28 expression redefines thymocyte development during the pre-T to DP transition. *Int Immunol.* 2010;22(5):387-97.
129. Yui MA, Rothenberg EV. Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(8):529-45.
130. Brekelmans P, van Soest P, Voerman J, Platenburg PP, Leenen PJ, van Ewijk W. Transferrin receptor expression as a marker of immature cycling thymocytes in the mouse. *Cell Immunol.* 1994;159(2):331-9.
131. Seitan VC, Hao B, Tachibana-Konwalski K, Lavagnoli T, Mira-Bontenbal H, Brown KE, et al. A role for cohesin in T-cell-receptor rearrangement and thymocyte differentiation. *Nature.* 2011;476(7361):467-71.



132. Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(5):309-22.
133. Dege C, Hagman J. Mi-2/NuRD chromatin remodeling complexes regulate B and T-lymphocyte development and function. *Immunol Rev.* 2014;261(1):126-40.
134. Gebuhr TC, Kovalev GI, Bultman S, Godfrey V, Su L, Magnuson T. The role of Brg1, a catalytic subunit of mammalian chromatin-remodeling complexes, in T cell development. *J Exp Med.* 2003;198(12):1937-49.
135. Del Real MM, Rothenberg EV. Architecture of a lymphomyeloid developmental switch controlled by PU.1, Notch and Gata3. *Development.* 2013;140(6):1207-19.
136. Dakic A, Metcalf D, Di Rago L, Mifsud S, Wu L, Nutt SL. PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *J Exp Med.* 2005;201(9):1487-502.
137. Garcia-Ojeda ME, Klein Wolterink RG, Lemaitre F, Richard-Le Goff O, Hasan M, Hendriks RW, et al. GATA-3 promotes T-cell specification by repressing B-cell potential in pro-T cells in mice. *Blood.* 2013;121(10):1749-59.
138. Germar K, Dose M, Konstantinou T, Zhang J, Wang H, Lobry C, et al. T-cell factor 1 is a gatekeeper for T-cell specification in response to Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(50):20060-5.
139. Li L, Leid M, Rothenberg EV. An early T cell lineage commitment checkpoint dependent on the transcription factor Bcl11b. *Science.* 2010;329(5987):89-93.
140. Mingueneau M, Kreslavsky T, Gray D, Heng T, Cruse R, Ericson J, et al. The transcriptional landscape of alphabeta T cell differentiation. *Nat Immunol.* 2013;14(6):619-32.
141. Zhang JA, Mortazavi A, Williams BA, Wold BJ, Rothenberg EV. Dynamic transformations of genome-wide epigenetic marking and transcriptional control establish T cell identity. *Cell.* 2012;149(2):467-82.
142. Engel I, Murre C. E2A proteins enforce a proliferation checkpoint in developing thymocytes. *EMBO J.* 2004;23(1):202-11.
143. Winandy S, Wu L, Wang JH, Georgopoulos K. Pre-T cell receptor (TCR) and TCR-controlled checkpoints in T cell differentiation are set by Ikaros. *J Exp Med.* 1999;190(8):1039-48.
144. Kleinmann E, Geimer Le Lay AS, Sellars M, Kastner P, Chan S. Ikaros represses the transcriptional response to Notch signaling in T-cell development. *Mol Cell Biol.* 2008;28(24):7465-75.
145. Kreslavsky T, Gleimer M, Miyazaki M, Choi Y, Gagnon E, Murre C, et al. beta-Selection-induced proliferation is required for alphabeta T cell differentiation. *Immunity.* 2012;37(5):840-53.
146. Dutta A, Sardi M, Gogol M, Gilmore J, Zhang D, Florens L, et al. Composition and Function of Mutant Swi/Snf Complexes. *Cell Rep.* 2017;18(9):2124-34.
147. Shih Ie M, Sheu JJ, Santillan A, Nakayama K, Yen MJ, Bristow RE, et al. Amplification of a chromatin remodeling gene, Rsf-1/HBXAP, in ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(39):14004-9.
148. Brown LA, Kalloger SE, Miller MA, Shih Ie M, McKinney SE, Santos JL, et al. Amplification of 11q13 in ovarian carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008;47(6):481-9.
149. Ren J, Chen QC, Jin F, Wu HZ, He M, Zhao L, et al. Overexpression of Rsf-1 correlates with pathological type, p53 status and survival in primary breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(9):5595-608.

150. Yang YI, Ahn JH, Lee KT, Shih Ie M, Choi JH. RSF1 is a positive regulator of NF-kappaB-induced gene expression required for ovarian cancer chemoresistance. *Cancer Res.* 2014;74(8):2258-69.
151. Liu S, Dong Q, Wang E. Rsf-1 overexpression correlates with poor prognosis and cell proliferation in colon cancer. *Tumour Biol.* 2012;33(5):1485-91.
152. Li Q, Dong Q, Wang E. Rsf-1 is overexpressed in non-small cell lung cancers and regulates cyclinD1 expression and ERK activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;420(1):6-10.
153. Xie C, Fu L, Xie L, Liu N, Li Q. Rsf-1 overexpression serves as a prognostic marker in human hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol.* 2014;35(8):7595-601.
154. Sheu JJ, Choi JH, Yildiz I, Tsai FJ, Shaul Y, Wang TL, et al. The roles of human sucrose nonfermenting protein 2 homologue in the tumor-promoting functions of Rsf-1. *Cancer Res.* 2008;68(11):4050-7.
155. Jin Q, Mao X, Li B, Guan S, Yao F, Jin F. Overexpression of SMARCA5 correlates with cell proliferation and migration in breast cancer. *Tumour Biol.* 2015;36(3):1895-902.
156. Gigeck CO, Lisboa LC, Leal MF, Silva PN, Lima EM, Khayat AS, et al. SMARCA5 methylation and expression in gastric cancer. *Cancer Invest.* 2011;29(2):162-6.
157. Wang Y, Qin J, Liu Q, Hong X, Li T, Zhu Y, et al. SNF2H promotes hepatocellular carcinoma proliferation by activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Oncol Lett.* 2016;12(2):1329-36.
158. Zhao XC, An P, Wu XY, Zhang LM, Long B, Tian Y, et al. Overexpression of hSNF2H in glioma promotes cell proliferation, invasion, and chemoresistance through its interaction with Rsf-1. *Tumour Biol.* 2016;37(6):7203-12.
159. Dai M, Lu JJ, Guo W, Yu W, Wang Q, Tang R, et al. BPTF promotes tumor growth and predicts poor prognosis in lung adenocarcinomas. *Oncotarget.* 2015;6(32):33878-92.
160. Zhao X, Zheng F, Li Y, Hao J, Tang Z, Tian C, et al. BPTF promotes hepatocellular carcinoma growth by modulating hTERT signaling and cancer stem cell traits. *Redox Biol.* 2019;20:427-41.
161. Meng J, Zhang XT, Liu XL, Fan L, Li C, Sun Y, et al. WSTF promotes proliferation and invasion of lung cancer cells by inducing EMT via PI3K/Akt and IL-6/STAT3 signaling pathways. *Cell Signal.* 2016;28(11):1673-82.
162. Gu L, Frommel SC, Oakes CC, Simon R, Grupp K, Gerig CY, et al. BAZ2A (TIP5) is involved in epigenetic alterations in prostate cancer and its overexpression predicts disease recurrence. *Nat Genet.* 2015;47(1):22-30.
163. Fujii T, Ueda T, Nagata S, Fukunaga R. Essential role of p400/mDomino chromatin-remodeling ATPase in bone marrow hematopoiesis and cell-cycle progression. *J Biol Chem.* 2010;285(39):30214-23.
164. Liu L, Wan X, Zhou P, Zhou X, Zhang W, Hui X, et al. The chromatin remodeling subunit Baf200 promotes normal hematopoiesis and inhibits leukemogenesis. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):27.
165. Bultman SJ, Gebuhr TC, Magnuson T. A Brg1 mutation that uncouples ATPase activity from chromatin remodeling reveals an essential role for SWI/SNF-related complexes in beta-globin expression and erythroid development. *Genes Dev.* 2005;19(23):2849-61.
166. Kokavec J, Zikmund T, Savvulidi F, Kulvait V, Edelmann W, Skoultschi AI, et al. The ISWI ATPase Smarca5 (Snf2h) Is Required for Proliferation and Differentiation of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Stem Cells.* 2017;35(6):1614-23.
167. Winandy S. Regulation of chromatin structure during thymic T cell development. *J Cell Biochem.* 2005;95(3):466-77.

168. Chi TH, Wan M, Lee PP, Akashi K, Metzger D, Chambon P, et al. Sequential roles of Brg, the ATPase subunit of BAF chromatin remodeling complexes, in thymocyte development. *Immunity*. 2003;19(2):169-82.
169. Naito T, Gomez-Del Arco P, Williams CJ, Georgopoulos K. Antagonistic interactions between Ikaros and the chromatin remodeler Mi-2beta determine silencer activity and Cd4 gene expression. *Immunity*. 2007;27(5):723-34.
170. Williams CJ, Naito T, Arco PG, Seavitt JR, Cashman SM, De Souza B, et al. The chromatin remodeler Mi-2beta is required for CD4 expression and T cell development. *Immunity*. 2004;20(6):719-33.
171. Wurster AL, Pazin MJ. BRG1-mediated chromatin remodeling regulates differentiation and gene expression of T helper cells. *Mol Cell Biol*. 2008;28(24):7274-85.
172. Yasui D, Miyano M, Cai S, Varga-Weisz P, Kohwi-Shigematsu T. SATB1 targets chromatin remodelling to regulate genes over long distances. *Nature*. 2002;419(6907):641-5.
173. Patenge N, Elkin SK, Oettinger MA. ATP-dependent remodeling by SWI/SNF and ISWI proteins stimulates V(D)J cleavage of 5 S arrays. *J Biol Chem*. 2004;279(34):35360-7.
174. de Boer J, Williams A, Skavdis G, Harker N, Coles M, Tolaini M, et al. Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre. *Eur J Immunol*. 2003;33(2):314-25.
175. Zikmund T, Kokavec J, Turkova T, Savvulidi F, Paszekova H, Vodenkova S, et al. ISWI ATPase Smarca5 Regulates Differentiation of Thymocytes Undergoing beta-Selection. *J Immunol*. 2019.
176. Mombaerts P, Clarke AR, Rudnicki MA, Iacomini J, Itohara S, Lafaille JJ, et al. Mutations in T-cell antigen receptor genes alpha and beta block thymocyte development at different stages. *Nature*. 1992;360(6401):225-31.
177. Mombaerts P, Iacomini J, Johnson RS, Herrup K, Tonegawa S, Papaioannou VE. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*. 1992;68(5):869-77.
178. Shen Y, Zhu YM, Fan X, Shi JY, Wang QR, Yan XJ, et al. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011;118(20):5593-603.
179. Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, Iwasaki H, Le Beau MM, Okuno Y, et al. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet*. 2004;36(6):624-30.
180. Curik N, Burda P, Vargova K, Pospisil V, Belickova M, Vlckova P, et al. 5-azacitidine in aggressive myelodysplastic syndromes regulates chromatin structure at PU.1 gene and cell differentiation capacity. *Leukemia*. 2012;26(8):1804-11.
181. Hoogenkamp M, Krysinska H, Ingram R, Huang G, Barlow R, Clarke D, et al. The Pu.1 locus is differentially regulated at the level of chromatin structure and noncoding transcription by alternate mechanisms at distinct developmental stages of hematopoiesis. *Mol Cell Biol*. 2007;27(21):7425-38.
182. Rosenbauer F, Koschmieder S, Steidl U, Tenen DG. Effect of transcription-factor concentrations on leukemic stem cells. *Blood*. 2005;106(5):1519-24.
183. Leddin M, Perrod C, Hoogenkamp M, Ghani S, Assi S, Heinz S, et al. Two distinct auto-regulatory loops operate at the PU.1 locus in B cells and myeloid cells. *Blood*. 2011;117(10):2827-38.
184. Lee BK, Iyer VR. Genome-wide studies of CCCTC-binding factor (CTCF) and cohesin provide insight into chromatin structure and regulation. *J Biol Chem*. 2012;287(37):30906-13.
185. Torrano V, Chernukhin I, Docquier F, D'Arcy V, Leon J, Klenova E, et al. CTCF regulates growth and erythroid differentiation of human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem*. 2005;280(30):28152-61.

186. Bell AC, Felsenfeld G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the *Igf2* gene. *Nature*. 2000;405(6785):482-5.
187. Dluhosova M, Curik N, Vargova J, Jonasova A, Zikmund T, Stopka T. Epigenetic control of *SP11* gene by CTCF and ISWI ATPase SMARCA5. *PLoS One*. 2014;9(2):e87448.
188. Ishihara K, Oshimura M, Nakao M. CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling. *Mol Cell*. 2006;23(5):733-42.
189. Wendt KS, Peters JM. How cohesin and CTCF cooperate in regulating gene expression. *Chromosome Res*. 2009;17(2):201-14.
190. Kim TH, Abdullaev ZK, Smith AD, Ching KA, Loukinov DI, Green RD, et al. Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. *Cell*. 2007;128(6):1231-45.
191. Alizadeh AA, Majeti R. Surprise! HSC are aberrant in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2011;20(2):135-6.
192. Bruns I, Cadeddu RP, Brueckmann I, Frobel J, Geyh S, Bust S, et al. Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2012;120(13):2620-30.
193. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, Shima T, Urata S, Yoshimoto G, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell*. 2011;20(2):246-59.
194. Maswabi BC, Molinsky J, Savvulidi F, Zikmund T, Prukova D, Tuskova D, et al. Hematopoiesis in patients with mature B-cell malignancies is deregulated even in patients with undetectable bone marrow involvement. *Haematologica*. 2017;102(4):e152-e5.
195. Kuranda K, Vargaftig J, de la Rochere P, Dosquet C, Charron D, Bardin F, et al. Age-related changes in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Aging Cell*. 2011;10(3):542-6.
196. Cheng H, Hao S, Liu Y, Pang Y, Ma S, Dong F, et al. Leukemic marrow infiltration reveals a novel role for *Egr3* as a potent inhibitor of normal hematopoietic stem cell proliferation. *Blood*. 2015;126(11):1302-13.
197. Perkins AC, Sharpe AH, Orkin SH. Lethal beta-thalassaemia in mice lacking the erythroid CACCC-transcription factor EKLF. *Nature*. 1995;375(6529):318-22.
198. Rodriguez P, Bonte E, Krijgsvelde J, Kolodziej KE, Guyot B, Heck AJ, et al. GATA-1 forms distinct activating and repressive complexes in erythroid cells. *EMBO J*. 2005;24(13):2354-66.
199. Phillips JE, Corces VG. CTCF: master weaver of the genome. *Cell*. 2009;137(7):1194-211.
200. Nativio R, Wendt KS, Ito Y, Huddleston JE, Uribe-Lewis S, Woodfine K, et al. Cohesin is required for higher-order chromatin conformation at the imprinted *IGF2-H19* locus. *PLoS Genet*. 2009;5(11):e1000739.
201. Wiechens N, Singh V, Gkikopoulos T, Schofield P, Rocha S, Owen-Hughes T. The Chromatin Remodelling Enzymes SNF2H and SNF2L Position Nucleosomes adjacent to CTCF and Other Transcription Factors. *PLoS Genet*. 2016;12(3):e1005940.
202. Barnden MJ, Allison J, Heath WR, Carbone FR. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol*. 1998;76(1):34-40.
203. Kim J, Lee SK, Jeon Y, Kim Y, Lee C, Jeon SH, et al. TopBP1 deficiency impairs V(D)J recombination during lymphocyte development. *EMBO J*. 2014;33(3):217-28.
204. Ye Y, Xiao Y, Wang W, Gao JX, Yearsley K, Yan Q, et al. Singular v dual inhibition of SNF2L and its isoform, SNF2LT, have similar effects on DNA damage but opposite effects on the DNA damage response, cancer cell growth arrest and apoptosis. *Oncotarget*. 2012;3(4):475-89.

205. Ye Y, Xiao Y, Wang W, Wang Q, Yearsley K, Wani AA, et al. Inhibition of expression of the chromatin remodeling gene, SNF2L, selectively leads to DNA damage, growth inhibition, and cancer cell death. *Mol Cancer Res.* 2009;7(12):1984-99.
206. Zhang D, Han J, Lu W, Lian F, Wang J, Lu T, et al. Discovery of alkoxy benzamide derivatives as novel BPTF bromodomain inhibitors via structure-based virtual screening. *Bioorg Chem.* 2019;86:494-500.
207. Kishtagari A, Ng KP, Jarman C, Tiwari AD, Phillips JG, Schuerger C, et al. A First-in-Class Inhibitor of ISWI-Mediated (ATP-Dependent) Transcription Repression Releases Terminal-Differentiation in AML Cells While Sparing Normal Hematopoiesis. *Blood.* 2019;132(Suppl 1):216.

## 13 Přílohy

(1. publikace) Kokavec J, **Zikmund T**, Savvulidi F, Kulvait V, Edelmann W, Skoultchi A. I, Stopka T, **The ISWI ATPase Smarca5 (Snf2h) is required for proliferation and differentiation of hematopoietic stem and progenitor cells.** *Stem Cells* (2017) 35(6):1614-23.

(2. publikace) **Zikmund T**, Kokavec J, Turkova T, Savvulidi F, Paszekova H, Vodenkova S, Sedlacek R, Skoultchi A. I, Stopka T, **ISWI ATPase Smarca5 Regulates Differentiation of Thymocytes Undergoing  $\beta$ -Selection** *The Journal of Immunology* (2019) doi: 10.4049/jimmunol.1801684. [Epub ahead of print].

(3. publikace) Dluhosova M, Curik N, Vargova J, Jonasova A, **Zikmund T**, Stopka T. **Epigenetic Control of SPI1 Gene by CTCF and ISWI ATPase SMARCA5.** *PlosOne* (2014) 9(2):e87448.

(4. publikace) Maswabi BC, Molinsky J, Savvulidi F, **Zikmund T**, Prukova D, Tuskova D, Klanova M, Vockova P, Lateckova L, Sefc L et al. **Hematopoiesis in patients with mature B cell malignancies is deregulated even in patients with undetectable bone marrow involvement.** *Haematologica* (2017) 102(4):e152-e5.